



REPÚBLICA DE CUBA

REC'D OCT 16 2003
10/527048 #2

REC'D 16 OCT 2003
WIPO PCT

OFICINA CUBANA
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL

Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número doscientos ocho del año dos mil dos del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS**, con fecha veintisiete de septiembre de dos mil dos, a las tres horas pasado meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, ciudadana cubana, a nombre y en representación del CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, cuya invención fue creada por Guillermo Selman-Housein Sosa; Eduardo Aguiar Cabeza; Annery del Carmen González Quintero y Osmany Ramos González.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos son iguales a las que obran en el expediente.

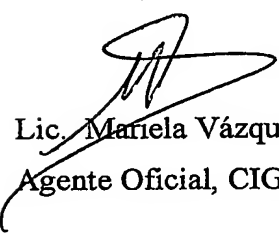
Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los once días del mes de septiembre de dos mil tres.

Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

RESUMEN**VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS**

Un vector de ADN que permite la inserción estable y la expresión de genes heterólogos en los genomas de plastidios de células de cualquier planta Angiosperma.. En este vector los genes a introducir se pueden insertar en múltiples sitios de clonación localizados en una región intergénica artificial que se obtiene de combinar los operones atpB y rbcL pertenecientes a plantas de clases diferentes (dicotiledóneas o monocotiledóneas). El casete de expresión se integra al genoma mediante recombinación entre las secuencias bordes atpB y rbcL del vector, con las correspondientes regiones homólogas del genoma plastídico; pudiendo expresarse más de un gen de interés a partir del promotor rbcL adyacente a la región borde que codifica para el gen atpB.


Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB





MEMORIA DESCRIPTIVA

VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS

Campo de la invención:

Esta invención se relaciona con la rama de la Biotecnología y más específicamente con la Ingeniería Genética de las Plantas. En particular, se proporcionan construcciones de ADN útiles para introducir con alta eficiencia y expresar genes foráneos en plastidios de plantas Angiospermas y se demuestra la utilidad de las mismas para obtener con alta eficiencia plantas transplastómicas que expresan proteínas heterólogas, en particular antígenos vacunales y proteínas de uso farmacéutico.

Estado del arte:

La ingeniería genética de las plantas es una tecnología que ha demostrado ser muy productiva para la investigación básica y la producción comercial de nuevos productos biotecnológicos (ver: Hammond J. Curr. Top. Microbiol. Immunol 1999, **240**:1-19; Simoens C. y Van Montagu M. Reproduction Update 1995, **1**:523-542).

Hasta hace pocos años, la producción de plantas transgénicas mediante el empleo del *Agrobacterium*, o por métodos directos de transformación se focalizaba en la inserción estable de los genes quiméricos introducidos en el núcleo de la célula vegetal (ver: Hansen G. y Chilton M.D. Curr. Top. Microbiol. Immunol 1999, **240**:21-57; Newell C.A. Mol. Biotechnol 2000, **16**:53-65). Sin embargo, algunas limitaciones que presenta la transformación nuclear solo pueden ser eliminadas mediante la introducción selectiva de los nuevos genes en los organelos de la célula vegetal (ver: Bogorad L. Trends in Biotechnology 2000, **18**:257-263; Heifetz P.B. Biochimie 2000, **82**:655-666). En particular, la expresión de genes heterólogos en los plastidios presenta las siguientes ventajas con respecto a su contraparte nuclear: 1) un nivel de expresión del transgen de 10 a 50 veces mayor que en el núcleo dado el alto número de copias de cada genoma por plastidio; 2) la inserción de los nuevos genes puede ser sitio específica por recombinación homóloga evitándose los efectos de posición, silenciamiento y otros fenómenos que influyen sobre la expresión de los genes introducidos al núcleo celular; 3) es posible la expresión de genes en operones, lo cual es muy deseable cuando se trata de hacer ingeniería de las vías metabólicas o de alterar caracteres que son multigénicos; 4) la heredabilidad de la información genética es materna, por lo que se evita que mediante el polen se dispersen en el ambiente los nuevos caracteres

introducidos, eliminándose así posibles daños al entorno. Adicionalmente, la expresión de genes en plastidios brinda la posibilidad de acumular allí proteínas heterólogas que en ese microambiente pudieran tener una mayor estabilidad, o del cual pudieran ser más fácilmente purificadas.

Diferentes métodos se han reportado para la introducción de genes en plastidios de algas y plantas superiores. En particular, han sido muy empleados el bombardeo con micropartículas aceleradas recubiertas de ADN (Boynton J.E; Gillham E.H; Hosler J.P; y otros. *Science* 1988, 240:1534-1538; Daniell H; Vivekananda J; Nielsen B; y otros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:88-92; Svab Z; Hajdukiewicz P; Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:8526-8530), y en menor escala la transformación de protoplastos vegetales mediante PEG (O'Neill C; Horvath G.V; Horvath E; y otros. *Plant J* 1993, 3:729-738; Golds T; Maliga P; Koop H-U. *Biotechnology* 1993, 11:95-97), y la microinyección (Knoblauch M; Hibberd J.M; Gray J.C; van Bel A.J.E. *Nature Biotechnol* 1999,17:906-909).

La inserción estable en el genoma plastídico de las secuencias de ADN introducidas, se ha logrado mayoritariamente utilizando los eficientes mecanismos de recombinación homóloga que naturalmente existen en estos organelos celulares (Blowers A.D; Bogorad L; Shark K.B.; Sanford J.C. *Plant Cell* 1989, 1:123-132; Staub J.M. y Maliga P. *Plant Cell* 1992, 4:39-45; Kavanagh T.A; Thanh N.D; Lao N.T; y otros. *Genetics* 1999, 152:1111-1122). Es de destacar que cuanto mayores sean las regiones homólogas, con más alta frecuencia ocurrirán los eventos de recombinación, siendo estos despreciables cuando las regiones homólogas son menores de 137pb (Zoubenko O.V; Allison L.A; Svab Z; Maliga P. *Nucleic Acid Res* 1994, 22:3819-3824).

Muchas regiones han sido propuestas como sitios adecuados de recombinación para insertar secuencias quiméricas en plastidios vegetales, entre ellas: *rbcL-accD*, *psbE-petA*, *trnV-rps7/12*, *trnV-16SrRNA* operon, *psbA-trnH*, *trnA-trnI*, la región 23SrRNA, etc (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:913-917; Zoubenko O.V; Allison L.A; Svab Z; Maliga P. *Nucleic Acid Res* 1994, 22:3819-3824; Daniell H; Datta R; Varma S; y otros. *Nature Biotechnol* 1998, 16:345-348; US Pat. 5,877,402; WO 9910513). A pesar de que algunas de estas regiones se recomiendan como universales para la integración de secuencias foráneas de ADN en los genomas de plastidios vegetales de diferentes especies de plantas, en realidad presentan algunas limitaciones en cuanto a su universalidad debido a una o más de las siguientes razones: 1) sus secuencias y/o estructuras no son altamente conservadas entre los genomas plastídicos de plantas de especies diferentes; 2) poseen regiones de alta homología muy pequeñas seguidas de, o interrumpidas por, intrones u otras regiones mucho

menos conservadas (lo que disminuye la frecuencia de recombinación homóloga y por ende de obtención de plantas con plastidios transgénicos (transplastómicas)); 3) se encuentran formando parte de operones naturales de los plastidios, por lo que una alteración dentro de estas estructuras puede afectar las tasas salvajes de transcripción para cada gen del operon o el correcto procesamiento de los RNA policistrónicos (Ohme M; Kamogashira T; Shinozaki K; Sugiura M. *Nucleic Acid Res* 1985, **13**:1045-1056), con las indeseables consecuencias que esto acarrea para el metabolismo del plastidio. De hecho, no es casual que utilizando vectores portadores de las regiones antes mencionadas como sitios de recombinación, solo se han reportado adecuadamente documentadas en publicaciones arbitradas producciones de plantas transplastómicas de tabaco (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:913-917), papa (Sidorov V.A; Kasten D; Pang S.Z; y otros. *Plant J* 1999, **19**:209-216) y tomate (Ruf S; Hermann M; Berger I.J; y otros. *Nature Biotechnol* 2001, **19**:870-875), todas especies Solanaceas muy cercanas evolutivamente y a nivel de estructura primaria del ADN. Adicionalmente, es de destacar que todos los vectores propuestos que utilizan estas regiones de recombinación muestran una baja eficiencia de producción de plantas transplastómicas homoplásmicas (plantas con todos sus genomas plastídicos homogéneamente transformados). Esto último se debe probablemente a que incluyen el uso de regiones terminadoras y promotores de origen plastídicos mayores de 174 pb (Iamtham S. y Day A. *Nature Biotechnol* 2000, **18**:1172-1176), lo que provoca que muchos eventos de transformación se malogren por recombinaciones entre estos elementos del vector y regiones homólogas del genoma plastídico dando lugar a plastidios no viables (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**:913-917; Kanevski I; Maliga P; Rhoades D.F; Gutteridge S. *Plant Physiol* 1999, **119**:133-141).

La región del genoma plastídico más universalmente conservada en cuanto a estructura y secuencia nucleotídica entre las plantas Angiospermas, es la compuesta por los operones que se transcriben en direcciones opuestas *atpB* y *rbcL*. De hecho, estos genes contienen segmentos de ADN mayores de 1500 pares de bases (pb) con homologías superiores al 85% entre plastidios de plantas pertenecientes a clases diferentes (dicotiledóneas o monocotiledóneas) y más del 91% de homología nucleotídica al analizar plantas de la misma clase (ver Tabla 1). Por otra parte, la región intergénica entre estos dos operones presenta una homología a nivel nucleotídico muy baja (menos del 50%) entre los plastidios de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Tabla 1. Homología a nivel nucleotídico entre los genes *rbcL* y *atpB* de plantas de diferentes especies y clases.

	Maíz	Tabaco	Arroz	Espinaca	
Maíz		86.0 %	95.5 %	86.2 %	atpB
Tabaco	86.1 %		86.6 %	91.8 %	
Arroz	95.1%	86.7%		87.0 %	
Espinaca	86.2%	91.1%	85.8%		
	rbcL				

La subunidad mayor de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) está codificada por el gen plastídico *rbcL*. Experimentalmente se ha determinado que la región carboxilo-terminal de la *rbcL* forma la alfa-hélice número 8 de esta proteína, y que esta región está involucrada en la interacción con la subunidad menor de esta enzima, codificada por el gen nuclear *rbcS* (Knight S; Andersson I; Branden C-I. J. Mol. Biol. 1990, 215:113-160; Curmi P.M.G; Cascio D; Sweet R.M; y otros. J. Biol. Chem. 1992, 267:16980-16989). A partir de estos y otros datos (Kanevski I; Maliga P; Rhoades D.F; Gutteridge S. Plant Physiol. 1999, 119:133-141), y considerando el menor grado de conservación entre las regiones C-terminal de proteínas *rbcL* de plastidios pertenecientes a especies de plantas diferentes, se plantea la hipótesis de que la alfa-hélice 8 de la *rbcL* define la especie especificidad de las interacciones entre las dos subunidades que forman la Rubisco.

Se ha demostrado que posiblemente gracias a una estructura tipo lazo que se encuentra cercana al inicio de transcripción del promotor *rbcL* (posición +1 a +26 a partir del inicio de transcripción), los RNA por él producidos se estabilizan, compensando con esto la disminución de la actividad transcripcional de este promotor durante la oscuridad (Shiina T; Allison L; Maliga P. The Plant Cell 1998, 10:1713-1722). Igualmente, varios segmentos de secuencias posicionados cerca o dentro de la región estructural de este promotor se asemejan a secuencias de factores de unión a ADN de cloroplastos (CDF), y pudieran tener un papel importante en la regulación transcripcional de este promotor.

Algunas particularidades que caracterizan la transcripción/traducción del operon *atpB-atpE* (codificante para las sub-unidades β y ϵ de la ATP-sintasa de cloroplastos) han sido reportadas (Shinozaki K; Deno H; Kato A; Sugiura M. Gene 1983, 24:147-155; Gatenby A.A; Rothstein S.; Nomura M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:4066-4070; Kapoor S;

Wakasugi T; Deno H; Sugiura M. *Curr. Genet.* 1994, 26:263-268). Estos dos genes están solapados, y en particular llaman la atención las características traduccionales de *atpE* basadas en un corrimiento del marco abierto de lectura, y una región conservada dentro de la región codificante para *atpB* que contiene un posible promotor de *atpE* (posiciones +1027 a +1064 de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína *atpB* de arroz, tabaco, etc.). La funcionalidad de este promotor *in vivo* no está totalmente demostrada, pero no se descarta que juegue algún papel en la regulación transcripcional de *atpE*.

El posible uso de la región intergénica *atpB-rbcL* como blanco para la inserción de genes foráneos en plastidios se describe únicamente por Cannon M.C. y Cannon F.C en la solicitud de patente europea No. 0 251 654. Sin embargo, esta patente propone el uso de un transposon bacteriano como vehículo para introducir genes foráneos en la región intergénica de estos dos operones divergentemente transcribibles. No es casual que Cannon M.C. y Cannon F.C. no reportaran la obtención de plantas transplastómicas, ya que la inserción de un transposon en esta región intergénica no solo interrumpe la reportada interacción entre los promotores *atpB* y *rbcL* (Hanley-Bowdoin L. y Chua N-H. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 215:217-224), sino que además (como es el caso del maíz y arroz por ejemplo) interrumpe la transcripción del gen *atpB* a partir del promotor NEP (promotor dependiente de polimerasa nuclear) que se encuentra dentro de la región 5' no traducible del gen *rbcL* (Welhe A. y Börner T. *Trends in Plant Science* 1999, 4:169-170). Es evidente que una correcta transcripción y regulación de la expresión de los productos codificados por estos operones son absolutamente necesarios para el adecuado funcionamiento y viabilidad de los plastidios. Adicionalmente, el vector de expresión descrito por Cannon M.C. y Cannon F.C. no contiene terminadores de la transcripción, un elemento indispensable para la expresión génica en plastidios (Stern D.B. y Kindle K.L. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13:2277-2285; Chen H.C. y Stern D.B. *Mol Cell Biol.* 1991, 11:4380-4388).

Además de regiones terminadoras de la transcripción, de las cuales también se pueden emplear exitosamente aquellas de origen bacteriano (Chen L.J. y Orozco E.M. Jr. *Nucleic Acid Res.* 1988, 16:8411-8431), es necesario que los genes introducidos a los plastidios se encuentren bajo promotores funcionales en los mismos. Entre los promotores más empleados para expresar genes en plastidios transgénicos se encuentran los promotores fuertes *Prrn* del ARNr 16S (Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:913-917) y el *PsbA* (Daniell H. *Methods in Molecular Biology* 1997, 62:463-489). El promotor *Prrn* es constitutivo, mientras que la transcripción/traducción de los ARN producidos por el promotor *PsbA* es inducida por la luz y depende de su región 5' no traducible. La delección de la región

5' no traducible del gen *psbA* hace independiente de la luz la expresión de su ARNm, sin embargo la traducción del mismo se ve afectada (Staub J.M. y Maliga P. *Plant J.* 1994, 6:547-553; Eibi C; Zou Z; Beck A; y otros. *Plant J.* 1999, 19:333-345). Estos promotores tienen secuencias -35 y -10 homólogas a los consensos descritos para los promotores bacterianos y se transcriben dependiente de una polimerasa codificada por el genoma plastídico (PEP) (Hess W. y Börner T. *Int. Rev. Cytol.* 1999, 190:1-59).

Entre otras similitudes entre los mecanismos de transcripción/traducción de plastidios y bacterias, también se ha demostrado que ARNm policistrónicos pueden ser expresados y eficientemente traducidos en plastidios de tabaco (Staub J.M. y Maliga P. *Plant J.* 1995, 7:845-848); siendo funcionales en cloroplastos las regiones de unión a ribosomas (RBS) que contienen secuencias tipo Shine-Dalgarno (Stern D.B; Higgs D.C; Yang J. *Trends Plant Sci.* 1997, 2:308-315).

Para facilitar la selección de las plantas transplastómicas, se ha propuesto entre otras variantes el uso de marcadores de selección positiva como por ejemplo: la kanamicina (Daniell H. *Methods in Molecular Biology* 1997, 62:463-489), o el más universalmente utilizado la espectinomycin (Svab Z; Hajdukiewicz P; Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:8526-8530; Svab Z. y Maliga P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:913-917); para lo cual el gen que confiere resistencia al compuesto de selección se clona en el vector de transformación bajo señales apropiadas para su correcta expresión en los plastidios.

A tono con la conservación de la naturaleza, se han elaborado tecnologías llamadas "limpias" que permiten eliminar de las plantas que se liberan al medio ambiente los genes que codifican para los marcadores de selección. Dos de estas metodologías aplicadas exitosamente en la producción de plantas transplastómicas son: la co-transformación con dos vectores y posterior segregación y eliminación de los individuos que portan el marcador de selección (Fisher N; Stampacchia O; Redding K; Rochaix J.D. *Mol. Gen. Genet.* 1996, 251:373-380) y la inserción del gen marcador entre dos secuencias repetidas en el casete de expresión para la posterior eliminación de este gen por recombinación homóloga durante el cultivo en medios no selectivos (Fisher N; Stampacchia O; Redding K; Rochaix J.D. *Mol. Gen. Genet.* 1996, 251:373-380; Iamtham S. y Day A. *Nature Biotechnol.* 2000, 18:1172-1176).

Descripción detallada de la invención:

El vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas que propone la presente invención, contiene un grupo de características propias que lo distinguen: 1) no se emplea un transposón para insertar fragmentos de ADN en el genoma plastídico; 2) las regiones bordes *atpB* y *rbcl* pertenecen a

plantas Angiospermas de clases diferentes formando una región intergénica artificial; 3) sitios múltiples de clonación en la región intergénica artificial transcripcionalmente inactiva, permiten la inserción de uno o más genes heterólogos sin afectar la correcta transcripción, procesamiento de los ARNm y expresión de los genes *atpB* y *rbcL*; 4) el diseño de nuestro vector permite la expresión de los genes introducidos sin necesidad de que porten secuencias promotoras o terminadoras, siempre y cuando las secuencias codificantes para proteínas estén precedidas por un sitio de unión a ribosomas (esto contribuye a disminuir eventos indeseables de recombinación y a un ahorro de recursos metabólicos de los plastidios, permitiendo una mayor estabilidad del fragmento de ADN heterólogo y un aumento de la frecuencia de producción de plantas homoplásmicas); 5) la estructura y secuencias de las regiones bordes que propone nuestra invención garantizan la universalidad del presente vector. Además, el vector que proporcionamos constituye una herramienta “limpia” para la introducción de genes en las plantas cultivables por cuanto su diseño permite que se elimine el marcador de selección, por recombinación homóloga entre secuencias repetidas, una vez que se han logrado las plantas transplastómicas homoplásmicas.

El diseño y la extensión de la región *atpB-rbcL*, con su región intergénica artificial, constituye la base del presente objeto de invención pues nos permite insertar de forma eficiente y estable genes y operones en el genoma de los plastidios de plantas Angiospermas de cualquier especie, sin provocarles ninguna alteración funcional.

Al diseñar la región intergénica artificial hubo que resolver el reto que representa el poder introducir en la misma un gen foráneo, sin afectar la interacción entre los promotores *rbcL* y *atpB*, y las tasas de transcripción natural de los mismos.

Por otra parte, hubo que considerar que los productos de los genes *atpB* y *rbcL* constituyen subunidades de enzimas que realizan funciones vitales para el mantenimiento de los plastidios y las plantas. Esta última situación impone limitaciones en cuanto a la longitud de los fragmentos seleccionados como bordes para la recombinación, por cuanto es de esperar que determinados dominios de estas proteínas estén involucrados en las interacciones proteína-proteína y pueden determinar el reconocimiento entre las diferentes subunidades de estas enzimas y su correcto plegamiento y funcionalidad.

Al utilizar la región *atpB-rbcL* como sitio de recombinación para la inserción de genes foráneos en los plastidios de plantas de especies diferentes, hay que considerar que se producirán proteínas híbridas, y por tanto merece especial atención lo planteado en el párrafo anterior. De esta forma, para evitar afectaciones en el correcto ensamblaje y funcionalidad de una Rubisco híbrida, postulamos que es necesario mantener invariable en el producto de la

recombinación la región del gen *rbcL* que codifica para la alfa-hélice 8. Así, durante el diseño del vector objeto de esta invención decidimos que el fragmento de ADN para la transformación de plastidios mediante recombinación homóloga, que incluye parte de la secuencia traducible del gen *rbcL* (en lo adelante llamado **borde-rbcL**), debía extenderse solo hasta la región amino-terminal de la alfa-hélice 8, y más específicamente hasta un triptofano (Trp-411) altamente conservado en esa posición en todas las *rbcL*s de las plantas Angiospermas.

Con relación a la región que codifica para el gen *atpB*, no se detecta ningún dominio con marcada variabilidad al comparar las secuencias de proteínas provenientes de plastidios de plantas de diferentes especies. Sin embargo, fueron tenidas en cuenta las particularidades transcripcionales/traduccionales del operon *atpB-atpE* al elegir el fragmento de ADN, que incluye parte de la secuencia traducible del gen *atpB* (en lo adelante llamado **borde-atpB**), para la integración de genes foráneos a plastidios mediante recombinación homóloga.

En nuestro diseño de la región intergénica artificial que nos permita insertar nuevos genes sin afectar la transcripción de *atpB* y *rbcL*, nos aprovechamos de la baja homología a nivel nucleotídico que muestra la región entre estos operones cuando comparamos secuencias de plastidios pertenecientes a plantas Angiospermas de clases diferentes.

En la construcción genética objeto de esta invención, el **borde-rbcL** debe comprender un fragmento de ADN que porta parte del gen y toda su región 5' regulatoria no transcribible. Este fragmento incluye: 1) el promotor PEP (dependiente de polimerasa codificada por el plastidio) de *rbcL* con las secuencias CDF asociadas a él; 2) la región 5' no traducible del gen *rbcL* y 3) la secuencia codificante para *rbcL* hasta la región que se corresponde con el N-terminal de la alfa-hélice 8. Así, el **borde-rbcL** en el vector objeto de esta invención va a extenderse desde la posición -291 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en *tabaco*, hasta la posición +1233 (Trp-411 en la secuencia aminoacídica) a partir del codón de inicio de traducción de este gen.

Es de destacar que al intentar clonar la región **borde-rbcL**, descubrimos que la expresión del gen *rbcL* a partir de su propio promotor es tóxica a la *E.coli*; por lo que fue necesario sustituir un fragmento poco conservado de la región 5' no traducible de este gen por un operador *lac* "ideal" (Simons A. y otros. 1984) y además, clonar este borde quimérico en un vector plasmídico de bajo número de copias (pBR322) que será propagado en una cepa bacteriana super-productora del represor *lacI* como por ejemplo XL1-Blue, JM101, etc.

En la construcción genética que proponemos se decidió tomar como el **borde-atpB** un fragmento de ADN que incluye: 1) el promotor *rbcL* adyacente y las secuencias tipo lazo

cercanas al inicio de transcripción que estabilizan los transcritos producidos por este promotor; 2) los promotores de *atpB* incluyendo su promotor NEP; 3) la región 5' no traducible del gen *atpB* y 4) la secuencia codificante para *atpB* hasta unos 300 pb antes del codon de parada del este gen. De esta forma, al diseñar el vector objeto de esta invención el borde-*atpB* se extiende desde la posición -654 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en arroz, hasta la posición +1211 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.

El promotor *rbcL* que contiene el borde-*atpB*, permite que a partir de él se pueda expresar con estabilidad un gen de interés en dirección contraria a la transcripción de *atpB-atpE*. Por conveniencia, bajo este promotor pudiera clonarse un casete genético conteniendo uno o más genes foráneos bajo un promotor funcional en plastidios, y de esta manera obtendríamos la expresión de ellos potenciada por la transcripción a partir de dos promotores en tándem.

Al introducir en un plásmido las regiones bordes anteriormente descritas, para su mantenimiento y multiplicación en *E. coli*, se clonan una a continuación de la otra separadas por un segmento de ADN que contiene sitios de clonación (MCS1, ver Figura 1-A) útiles para la inserción de los genes heterólogos que se pretendan introducir posteriormente al genoma de los plastidios. Con esta estructura, en que las direcciones de la transcripción de los genes *atpB* y *rbcL* van a ser divergentes, y debido a que la región promotora *rbcL* está duplicada, se obtienen dos fragmentos de ADN repetidos y en la misma dirección bordeando la región que contiene los sitios de clonación; sin embargo, debido a la baja homología existente en esta región intergénica entre genomas plásticos de Angiospermas de clases diferentes, no ocurre ningún evento de recombinación homóloga ya que solo un fragmento de aproximadamente 90 pb presenta un alto grado de homología.

La construcción anteriormente descrita es la base del vector objeto de esta invención, donde además se introducirá en el MCS1, en dirección 5'-3' a partir del promotor *rbcL* del borde-*atpB*, un gen que codifique para un marcador que permita la selección positiva de las células transformadas, bordeado por secuencias de ADN repetidas que facilitarán mediante recombinación homóloga la eliminación del marcador una vez obtenidas las plantas transplastómicas homoplásmicas, si esto fuera deseado. La terminación de la transcripción del gen marcador, o de cualquier otro gen que se inserte en el MCS1, estará dada por un terminador bacteriano que se coloca adyacente al extremo 5' del borde-*rbcL* (preferiblemente el terminador bidireccional *rrnBT1T2* del operon *rrnB* de *E. coli* (Brosius J; Dull T.J; Sleeter D.D; Noller H.F. J. Mol. Biol. 1981, 148:107-127) evitando que la actividad transcripcional

del fragmento insertado interfiera el normal funcionamiento del promotor natural de este borde.

De esta forma, la estructura general del vector objeto de esta invención se muestra en la Figura 1-B, donde el gen, o los genes, de interés se pueden clonar bajo el promotor *rbcL* del borde-*atpB* formando una unidad transcripcional mono o policistrónica (Figura 1-C), o bajo otros promotores funcionales en plastidios pudiéndose obtener por ejemplo una unidad policistrónica bajo dos promotores en tandem (Figura 1-D), o dos unidades transcripcionales independientes bajo diferentes combinaciones de regiones promotoras (Figuras 1-E y Figura 1-F).

Para facilitar la selección de las plantas transplastómicas, nosotros decidimos usar como marcador de selección la higromicina, ya que a pesar de que este antibiótico es extremadamente tóxico a plantas dicotiledóneas como el tabaco, y por lo tanto debe ser empleado con moderación, resulta mucho más efectivo como agente selectivo para la obtención de plantas monocotiledóneas con plastidios modificados genéticamente. Por esto, el gen *hgh* que codifica para la resistencia a la higromicina-B en *Klebsiella* (Gritz L. y Davies J. Gene 1983, 25:179-188), conteniendo una región Shine-Dalgarno adecuada, es clonado en el MCS1 bajo el promotor *rbcL* del borde-*atpB* (Figura 1-B).

A fin de ofrecer una herramienta ecológica, en el vector objeto de esta invención el gen marcador fue introducido bordeado por dos secuencias de ADN repetidas que permiten su eliminación mediante recombinación homóloga (Figura 1-B), una vez que ya obtenidas las plantas transplastómicas se elimina el agente selectivo del medio de cultivo. Las secuencias repetidas que empleamos en nuestra construcción son provenientes de la región que codifica para la proteína s10 del fago T7 (Dunn J.J. y Studier F.W. J. Mol. Biol. 1983, 166:477-535). Nuestros vectores tienen la particularidad de que al eliminar solo el gen marcador, se mantienen inalterables el resto de las secuencias regulatorias de su operon (Figuras 1-C, 1-D, 1-E y 1-F); así, cualquier gen transcripcionalmente fusionado al gen marcador continuará inalterable su expresión, economizándose los recursos del vector. Esta arquitectura es otra de las cualidades que distinguen al vector objeto de esta invención de otros sistemas descritos como vehículos para la modificación genética de plastidios.

Es obvio que otros genes que confieran resistencia a antibióticos como a la espectinomicina (Chinault A.C; Blaskley V.A; Roessler E; Willis D.G; y otros. Plasmid 1986, 15:119-131), o a las sulfonamidas (Guerineau F; Mullineaux P. Nucleic Acid Res 1989, 17:4370), podrían ser también utilizados para facilitar la selección de las plantas transplastómicas. De la misma forma, genes que confieran resistencia a compuestos herbicidas como el glifosato (Shah D.M;

Horsch R.B; Klee H.J; Kishore G.M; y otros. Science 1986, **233**:478-481; Comai L; Facciotti D; Hiatt W.R; Thompson G; y otros. Nature **317**:741-744), el glufosinato (DeBlock M; Botterman J; Vandewiele M; Dockx J; y otros. EMBO Journal 1987, **6**:2513-2518), asulam (Guerineau F; Brooks L; Meadows J; Lucy A; y otros. Plant Mol Biol 1990, **15**:127-136), bromoxinil (Stalker D.M. y McBride K.E. J. Bacteriol 1987, **169**:955-960), sulfonilureas y imidazolinonas (LaRossa R.A y Smulky D.R. J. Bacteriol 1984, **160**:391-394), etc, pueden ser clonados en la región intergénica artificial y empleados como marcadores de selección con la ventaja adicional de que este es un carácter agronómico deseable.



Para alguien con experiencia en el estado del arte y las técnicas de la ingeniería genética, es obvio que lo aquí descrito permite utilizar como regiones bordes para la integración de genes en el genoma de plastidios de plantas Angiospermas, cualquier combinación de las regiones *atpB* y *rbcL*, con todas o parte de las características descritas, siempre y cuando su fuente sean plastidios de plantas pertenecientes a Angiospermas de clases diferentes (monocotiledóneas o dicotiledóneas). Igualmente, múltiples genes, marcadores de selección y combinaciones de cistrones y operones son posibles de clonar en el MCS1 de la región intergénica artificial del vector que aquí se propone (Figura 1-A), a fin de insertarlos establemente y expresarlos en plastidios de cualquier planta Angiosperma.

Depósito de microorganismos

Los plásmidos pVTPA-HB-aadA, pVTPA-f-GUS, pVIEP fueron depositados bajo las reglamentaciones del Tratado de Budapest para el depósito de microorganismos en el *Belgian Coordinated collection of Microorganisms BCCM, LMBP-COLLECTION* con número y fecha de depósito penidentes.

Descripción de las Figuras:

Figura 1. A, estructura base para la construcción del vector objeto de la presente invención mostrando la región que contiene sitios para la clonación (MCS1) acotada por:

el borde-*atpB*  y el borde-*rbcL*  pertenecientes a Angiospermas de clases diferentes (monocotiledóneas ó dicotiledóneas).

B, estructura general del vector objeto de la presente invención (*rbcLpr*- promotor del gen *rbcL*, *atpBpr*- promotor del gen *atpB*, Term- terminador de la transcripción de origen no plastídico, Marcador- gen marcador de selección, R1, R2- secuencias repetidas que permiten eliminar el gen marcador por recombinación homóloga).

C, D, E, F, variantes del vector objeto de la presente invención mostrando las posibilidades de expresar uno o más genes de interés (gen, gen1, gen2) como unidades

monocistrónicas (E, F) bicistrónicas (C, E, F) o tricistrónicas (D), bajo uno (C, E, F) o más (D, F) promotores funcionales en plastidios (Pr, Pr1, Pr2).

Figura 2. Mapa del vector para transformación de plastidios de plantas Angiospermas pVTPA-f.

Figura 3. Mapa del vector para transformación de plastidios de plantas Angiospermas pVTPA.

Figura 4. Mapa del vector intermediario para la expresión de genes en plastidios pVIEP. (S/D- secuencia Shine-Dalgarno).

Figura 5. Southern blot de 10 µg de ADN de cloroplastos purificados por gradiente de sacarosa, digerido con Pst I y empleando como sonda marcada con ^{32}P el fragmento 5' del gen *rbcL*. Carril-1: planta no transformada; carriles-2 al 6: plantas transformadas (se puede apreciar que todas son homoplásmicas); carriles 7 y 8, plantas transformadas crecidas en ausencia del agente de selección durante el último ciclo de cultivo *in vitro* (notar que en la primera de ellas aún no ha ocurrido la total eliminación del gen marcador por recombinación).

Figura 6. Demostración mediante Western blot del uso de nuestros vectores de transformación para la expresión del antígeno de superficie de la hepatitis B en cloroplastos. 10 µg de proteínas totales de hojas fueron analizados en cada corrida. Carril-1: planta no transformada; carriles 2-5: plantas transplastómicas que expresan el HBsAg (obsérvese la señal revelada por el anticuerpo contra el virus de la hepatitis B a la altura esperada de aproximadamente 25 KDa).

Figura 7. Demostración mediante Western blot del uso de nuestros vectores de transformación para la expresión en plastidios de las cadenas proteicas que conforman un anticuerpo monoclonal. 10 µg de proteínas totales de hojas fueron analizados en cada corrida. Carril-1: planta no transformada; carriles 2-5: plantas transplastómicas que expresan el anticuerpo recombinante CB-Hep.1 (obsérvese las señales correspondientes a las cadenas pesada (50 KDa) y ligera (25 KDa) de la inmunoglobulina).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

Ejemplo No.1: Construcción de vectores para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas.

a) Obtención del borde-*rbcL*.

El fragmento borde-*rbcL* fue construido de la siguiente forma: utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.1 y No.2 se amplificó un fragmento de ADN de 1524 pb correspondiente al gen que codifica para la RBCL de tabaco mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el PCR se empleó ADN purificado de cloroplastos de hojas de *N. tabacum* var. SR1. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pBluescript II SK (Stratagene, USA), previamente digerido con las enzimas de restricción EcoRV y SpeI/Klenow, obteniendo los clones pBSrbcL. Varios de los clones positivos fueron sometidos a secuenciación automática de ADN, y se demostró que a pesar de emplear una polimerasa de alta fidelidad al realizar los PCR (Pfu ADN Polimerasa, Promega, USA) todos los clones presentaban mutaciones. Este hecho, más otras evidencias no concernientes a la presente invención, nos indicó que la RBCL de tabaco estaba siendo tóxica a la *E. coli* al expresarse a partir de su propio promotor; por esta razón, decidimos mutagenizar un fragmento poco conservado de la región 5' no traducible del gen *rbcL* a fin de crear allí un operador lac "ideal" que nos permitiera clonar este fragmento borde en cepas de *E. coli* lacI⁺. Para realizar la mutagénesis, el clon pBSrbcL13 (que contiene una mutación en el fragmento SacII-BamHI del gen *rbcL*) fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI, que cortan la secuencia de *rbcL* en las posiciones -162 y -29, y se sustituyó este fragmento del gen *rbcL* por un fragmento de ADN sintético con la región -124 a -97 alterada de forma tal que formara un sitio de unión "ideal" del represor lac (Secuencia No.3).

Una vez insertado el operador lac en el clon pBSrbcL13 (llamado ahora pBSrbcL13lacOp), escindimos el fragmento *rbcL* mediante restricción con las enzimas SalI y XbaI/Klenow, y lo clonamos en el vector de bajo número de copias pBR322 (New England Biolabs, USA) digerido con las enzimas SalI y EcoRV (el sitio XbaI se restituye), para obtener el plásmido pBR322rbcL13lacOp, en el cual el gen *rbcL* se transcribe en dirección SalI-XbaI.

A continuación, la mutación presente en el clon *rbcL*13 fue eliminada sustituyendo el fragmento SacII-BamHI del pBR322rbcL13lacOp por un fragmento SacII-BamHI libre de mutaciones obtenido de otro clon pBSrbcL secuenciado. De esta forma obtenemos el plásmido pBR322rbcLOK, conteniendo el borde-*rbcL* (Secuencia No.4).

b) Obtención del borde-atpB.

El fragmento borde-atpB fue construido de la siguiente forma: utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.5 y No.6, se amplificó un fragmento de ADN de 1754 pb correspondiente al gen que codifica para la ATPB de arroz mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el PCR se empleó ADN purificado de cloroplastos de hojas de *Oriza sativa* var. IAC-18. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pBluescript

II KS (Stratagene, USA), previamente digerido con la enzima de restricción HincII, (hacia la región 5' del fragmento clonado se restituye el sitio HincII(SalI)) obteniendo los clones pBSatpB. Varios de los clones positivos fueron sometidos a secuenciación automática de ADN, seleccionándose un clon totalmente correcto.

Mediante digestión HindIII-SalI (se restituye la secuencia original y se pierde el sitio SalI) y ligazón, se adicionó a la región 5' del clon seleccionado de atpB, un fragmento sintético de ADN que porta sitios de restricción adicionales y parte de la región 5' no traducible del gen atpB de arroz que contiene el promotor NEP (secuencia No.7), dando lugar al plasmidio pBSatpBcompleto. En este vector el gen *atpB* se transcribe en dirección HindIII-XhoI. La secuencia nucleotídica del borde-atpB construido se muestra en la secuencia No.8.

c) Obtención del casete de selección con bordes repetidos.

El fragmento de ADN de aproximadamente 1Kb que contiene el gen que codifica para la resistencia a higromicina (*hgh*) fue obtenido a partir del plasmidio pBSBar, mediante amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.9 y No.10, que incorporan una región tipo Shine-Dalgarno 7 pb antes del inicio de traducción y sitios de restricción para facilitar la manipulación de este fragmento. El ADN amplificado fue digerido con KpnI y clonado en el vector pUC19 previamente digerido con SmaI (el sitio SmaI se conserva después de la ligazón) y KpnI, para dar lugar al plasmidio pUC19Hyg. A continuación, después de digerir el plasmidio obtenido con HindIII y SmaI, se introdujo un fragmento de ADN sintético conteniendo sitios de restricción que nos serán de utilidad para las manipulaciones genéticas y clonajes posteriores (secuencia No.11); el vector así obtenido fue nombrado pUC19-linker-Hyg.

El fragmento de ADN que fungirá como la región repetida que por recombinación homóloga permitirá eliminar el gen marcador una vez obtenidas las plantas transplastómicas, fue obtenido de un fragmento de ADN que codifica para la proteína s10 del fago T7 presente en el vector de expresión pET3xb (Novagen, USA). El vector pET3xb fue inicialmente digerido con BamHI-NdeI, y el fragmento de 780pb obtenido fue re-digerido con TaqI/Klenow y KpnI de forma tal que se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 310pb que clonamos en el vector pUC19 previamente digerido con SmaI y KpnI, para obtener el plasmidio pUC-Spacer.

El fragmento del gen s10 clonado en el pUC-Spacer fue escindido mediante digestión con XbaI/Klenow y KpnI e introducido hacia el 3' del gen *hgh* en el vector pUC19-linker-Hyg digerido con EcoRI/Klenow y KpnI, para obtener el plasmidio pUC19-linker-Hyg-spacer.

El segundo borde repetido clonado 5' al gen *hgh* se introdujo obteniendo el spacer mediante digestión del pUC-Spacer con EcoRI/Klenow y BamHI, e insertándolo en el pUC19-linker-Hyg-spacer previamente digerido con SmaI y BglII, obteniendo el plasmidio pUC-linker-spacer-Hyg-spacer.

El terminador bidireccional *rrnBT1T2* de *E.coli* se obtuvo mediante digestión con BspHI/Mung bean nuclease y HindIII del vector pTrcHisB (Invitrogen, USA) y clonando la banda de 470pb en el pBluescript II SK digerido con HindIII y SmaI (pBS-*rrnT1T2*).

Finalmente, mediante digestión con HindIII/Klenow y XbaI se escindió el fragmento de ADN conteniendo el terminador *rrnBT1T2* del pBS-*rrnT1T2* y se introdujo al vector pUC-linker-spacer-Hyg-spacer hacia el 3' del spacer que está a continuación del gen *hgh*, con digestión BamHI/Klenow y XbaI; así obtenemos la construcción pUC-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2*, de donde el casete desde el linker hasta el terminador fue escindido mediante digestión HindIII-XbaI y clonado en el vector pBluescript II SK digerido con estas mismas enzimas de restricción para obtener el plásmido con el casete de selección con bordes repetidos pBS-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2* (secuencia No.12).

d) Construcción del vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas, pVTPA-f.

El vector para la transformación estable y expresión de genes heterólogos en plastidios de plantas Angiospermas que esta invención propone se ensambló paso a paso de la siguiente forma: el casete de selección con bordes repetidos se escindió mediante digestión con NotI/Klenow y SalI del plasmidio pBS-linker-spacer-Hyg-spacer-*rrnT1T2*, y se insertó en el vector pBR322 previamente digerido con EcoRI/Klenow y SalI para producir el plásmido pBR322-sp-Hyg-sp-T; a continuación, el plásmido obtenido se digirió con BamHI/Klenow y XbaI y en él se insertó el borde-*rbcL* extraído de la construcción pBR322-*rbcLOK* mediante digestión con HindIII/Klenow y XbaI conformándose el vector pBR-sp-Hyg-sp-T-*rbcL*; finalmente, el borde-*atpB* se escindió del plásmido pBSatpBcompleto mediante digestión con HindIII y XhoI y se clonó en la construcción pBR-sp-Hyg-sp-T-*rbcL* previamente digerido con HindIII y SalI. De esta forma obtenemos un vector con la estructura descrita en la Figura 1-B, al que llamamos pVTPA-f (ver mapa en la Figura 2) y cuya secuencia nucleotídica del fragmento de ADN clonado entre las posiciones +651 (sitio SalI) y +1 (sitio EcoRI) del vector receptor pBR322, se muestra en la secuencia No.13.

Por sus características, el vector pVTPA-f permite la transformación estable de plastidios de Angiospermas y la obtención de plantas transplastómicas que expresen las proteínas recombinantes codificadas por los genes clonados en él, siempre y cuando los mismos estén

precedidos de secuencias de ADN que permitan la unión a los ribosomas y el inicio de la traducción.

e) Vector pVTPA: variante del vector pVTPA-f que permite insertar y expresar en plastidios varios genes como unidades transcripcionales independientes.

Una variante de vector para la transformación estable en plastidios y la expresión de varios genes como unidades transcripcionales independientes, se obtiene insertando dentro de los sitios de clonación del pVTPA-f una secuencia de ADN capaz de promover la transcripción en plastidios y secuencias terminadoras de la transcripción (ver Figura 1-E). Con este fin, y a modo de ejemplo, un fragmento sintético que codifica para el promotor de la subunidad 16S de los ARN ribosomales de plastidios (Prn) (secuencia No. 14), y conteniendo sitios de clonación para facilitar las manipulaciones genéticas, fue insertado entre los sitios EcoRI y SmaI del vector pBluescript II SK, para obtener el plásmido pBS-Prn. Posteriormente, el fragmento de ADN conteniendo el promotor Prn fue escindido del pBS-Prn mediante digestión con las enzimas HindIII y MluI e insertado entre estos mismos sitios del vector pVTPA-f para dar lugar a la construcción pVTPA (ver Figura 3, y secuencia No.15).

Ejemplo No.2: Expresión de una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-f-GUS).

Para que utilizando el vector pVTPA-f se pueda expresar un gen heterólogo en plantas transplastómicas, es necesario que el mismo posea una región de unión a ribosomas (RBS) a distancia adecuada (5 a 15 pb) del codón de inicio de la traducción. Por esta razón, a fin de facilitar la clonación de genes en nuestro vector para la transformación y expresión de genes en plastidios, diseñamos un vector intermediario (pVIEP) que permite clonar en él el gen de interés y después escindirlo mediante digestión enzimática para insertarlo en el vector pVTPA-f (o pVTPA). El paso de clonación en el vector pVIEP ayuda a introducir un RBS al gen de interés, al mismo tiempo que permite adicionarle un terminador de la transcripción o promotor adicional para su expresión a partir del vector objeto de esta invención.

Para construir el vector pVIEP, se clonó en el pBluescript II Sk digerido con EcoRI y SmaI un fragmento sintético de ADN que porta el promotor del gen psbA de tabaco con parte de su región 5' no traducible (entre la posición -68 y -25 a partir del inicio de traducción) delecionada para evitar el control de la traducción de este gen por la luz (PpsbA*, secuencia No.16). Así obtenemos el plásmido pBSPpsbA, al cual se le adicionó a continuación del promotor PpsbA*, mediante digestión NdeI-SacI (el sitio SacI se pierde después de este clonaje), un fragmento sintético que incluye un minicistrón (para estabilizar el mRNA y

favorecer la traducción del mismo) y proporciona un RBS y múltiples sitios para el clonaje de un gen en él (secuencia No.17). Al plásmido resultante se llamó pBSPpsbA-linker.

El vector pVIEP se obtuvo finalmente insertando en el pBSPpsbA-linker digerido con BamHI y StuI el terminador de la transcripción T7 (T ϕ) obtenido del plásmido pET3c (Novagen, USA) mediante digestión con BamHI y EcoRV. La secuencia No.18 se corresponde con la estructura primaria del vector pVIEP (entre el sitio KpnI y el segundo sitio SalI), y su mapa se muestra en la Figura 4.

Una versión del vector intermediario pVIEP sin el promotor PpsbA* y sin minicistrón se obtuvo por digestión del mismo con EcoRI/Mung bean nucleasa y SnaBI, y religando este plásmido para obtener la construcción pVIEP-2.

Para expresar una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas, el gen *uidA* (*gus*) se obtuvo del plásmido pDMC200 (CAMBIA) mediante digestión con NcoI y SmaI, y fue clonado en el pVIEP-2 igualmente digerido para obtener el pVIEP-GUS; de este plásmido fue obtenida la secuencia que codifica para el gen *uidA* fusionada a un RBS mediante digestión con HindIII-SmaI y clonada bajo el promotor *rbcL* de arroz en el vector para transformación de plastidios pVTPA-f digerido con MluI/Klenow y HindIII. Esta construcción la llamamos pVTPA-f-GUS (secuencia No.19) que, mientras se mantenga la selección en las etapas de transformación, va a expresar el gen *uidA* e *hgh* como una unidad bicistrónica bajo el promotor *rbcL* de arroz; sin embargo, una vez que sea eliminado por recombinación el marcador de selección al cultivar las plantas transplastómicas en condiciones no selectivas, se mantendrá la expresión del gen *uidA* como una unidad monocistrónica. La funcionalidad de esta construcción se demostró obteniendo plantas transplastómicas de tabaco según la metodología que describimos a continuación:

Se toman hojas de plantas de tabaco (var. SR1) de entre 4 a 6 semanas de crecidas in vitro y se colocan con el lado abaxial hacia arriba en medio de inducción de brotes (SI: Sales y Vitaminas MS (Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.* 1962, 15:493-497), BAP 1mg/L, NAA 0.1mg/L, Sacarosa 25g/L, Fitagel 4g/L, pH 5.7) con 0.4 M de manitol para un pre-tratamiento osmótico por 2 a 4h. Los microproyectiles para el bombardeo se preparan empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m (BioRad), según protocolo publicado (Russell D.R., Wallace K.M., Bathe J.H., y otros. *Plant Cell Rep.* 1993, 12:165-169). La transformación se realiza empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por hoja. Las hojas bombardeadas se mantienen en el mismo medio iso-osmótico por 14 a 16 horas adicionales y posteriormente

se pasan a medio SI por dos días. A continuación las hojas bombardeadas se cortan en fragmentos de 3x3mm aproximadamente y se transfieren, con el lado abaxial hacia abajo, a medio SI con 5mg/L de Higromicina-B (Duchefa, Holanda). Los callos resistentes y brotes verdes aparecen entre las 6 y 8 semanas de cultivo; se separan del tejido muerto y se transfieren al mismo medio selectivo para un segundo y tercer ciclos de selección en concentraciones crecientes de Higromicina-B (10mg/L y 15mg/L). Finalmente, los brotes resistentes obtenidos se pasan a medio MS (Sales y Vitaminas MS, Sacarosa 30g/L, Fitagel 4g/L, pH 5.7) con Higromicina-B a 15 mg/L, para su desarrollo y enraizamiento. Todo el cultivo se realiza con un régimen de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

La actividad GUS de algunos de los clones obtenidos resistentes a Higromicina fue analizada mediante ensayo histoquímico empleando X-Gluc según la metodología descrita por Jefferson (Jefferson R.A. Plant Mol. Biol. Rep. 1987, 5:387-405).

Los resultados de 3 experimentos de transformación y sus controles, se muestran en la Tabla 2

Tabla 2 Obtención de plantas transplastómicas con la construcción pVTPA-f-GUS.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones GUS ⁺
I	10	11	11/11
II	10	14	14/14
III	10	9	9/9
Sumatoria	30	34	34/34
Controles negativos (bombardeados sin plásmido)	30	0	-

Adicionalmente, para algunos clones tomados al azar se demostró la integración del fragmento de ADN quimérico en el genoma de los cloroplastos mediante Southern blot (Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2da edición. Cold Spring Habor Laboratory Press) de ADN de cloroplastos purificados por gradiente de sacarosa, digerido con Pst I y empleando como sonda marcada un fragmento del gen *rbcL* (Figura 5). La banda de aproximadamente 6.8 Kb esperada en los clones positivos fue detectada en todos los clones analizados y no en el control sin transformar (donde se detectó la banda característica de 21.5 Kb); cuando algunos de estos clones fueron propagados sin el agente de selección en el medio de cultivo, se observó en el Southern blot que la talla de la banda de ADN que hibrida con la sonda marcada disminuye hasta 5.5 Kb, lo

cual confirma la eliminación del gen marcador *hgh* por recombinación homóloga entre las secuencias que lo rodean.

Algunos clones transplastómicos después de ser propagados se llevaron a macetas con tierra para obtener de ellos semillas mediante autocruces. Germinando las semillas obtenidas en medio MS sin y con Higromicina-B a 15mg/L, se demostró la eliminación del marcador de selección en estos clones, mientras que la actividad GUS se mantuvo invariable, por lo que también se confirmó la naturaleza homoplásmica de las plantas así obtenidas.

En nuestros experimentos constatamos además, que a diferencia de lo observado cuando se emplea como marcador de selección la resistencia a Espectinomicina, no obtuvimos falsos transformantes al emplear Higromicina-B. Sin embargo, se hizo necesario establecer las concentraciones adecuadas del agente selectivo para poder recobrar las plantas transformadas.

Todos estos datos experimentales confirman la funcionalidad del vector objeto de la presente invención, y su utilidad para obtener plantas transplastómicas que expresen genes de interés cualesquiera que sea la fuente de los mismos.

Ejemplo No.3: Expresión bajo dos promotores de una unidad monocistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-aadA).

Utilizando el vector pVTPA es posible expresar en plastidios un gen bajo los promotores *rbcL* de arroz y *Prn*; para esto el gen que codifica para la amino-glicósido adenil-transferasa (*aadA*, confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina, espectinomicina y otros) fue amplificado por PCR a partir del vector pDE1001 (Dpto. de Genética, Univ. de Gante Bélgica) utilizando los oligonucleótidos descritos en las secuencias No.20 y No.21. El producto de la reacción de PCR se clonó directamente en el vector pVTPA digerido con *XhoI*/Klenow bajo los dos promotores antes mencionados para dar lugar a la construcción pVTPA-aadA (secuencia No.22). La obtención de plantas transplastómicas de tabaco se realizó según la metodología descrita en el Ejemplo anterior (Ejemplo No.2), con la particularidad de que inicialmente se realizó la selección de los clones transplastómicos utilizando espectinomicina a 500 mg/L en el medio SI, y después estreptomicina a 500 mg/L durante el segundo ciclo de selección. En estos experimentos se realizaron transformaciones adicionales con el vector pVSR326MOD (CIIGB, Nueva Delhi, India) para obtener datos que nos permitan hacer comparaciones en cuanto a las frecuencias de obtención de plantas transplastómicas. El vector pVSR326MOD tiene clonado en la región entre los genes *rbcL* y *accD* de tabaco dos casetes de expresión que contienen el gen *gus* bajo la regulación del promotor *psbA* y el terminador de este mismo gen, y el gen *aadA* bajo el promotor *Prn* y el

terminador del gen *rbcL*. Los resultados de estas transformaciones después de dos rondas de regeneración/selección y tres sesiones de cultivo sin selección se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Comparación de la frecuencia de transformación entre el pVTPA-aadA y el pVSR326MOD.

Experimento	Construcción genética	No. de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Espectinomicina	No. de clones/hoja bombardeada
I	pVTPA-aadA	10	19	1.9
	pVSR326MOD	10	13	1.3
II	pVTPA-aadA	10	11	1.1
	pVSR326MOD	10	8	0.8
III	pVTPA-aadA	10	16	1.6
	pVSR326MOD	10	10	1.0
Sumatoria	pVTPA-aadA	30	46	1.5 ± 0.4
	pVSR326MOD	30	31	1.0 ± 0.3
Controles negativos (bombardeados sin plásmido)	-	20	4	0.2

Los resultados experimentales obtenidos confirman nuestra hipótesis de que el vector objeto de esta invención tiene una mayor frecuencia de producción de plantas transplastómicas que otros vectores que portan múltiples secuencias de origen plastídico. Adicionalmente, demostramos la posibilidad que nos brinda el vector que proponemos para la expresión de un gen foráneo (en este caso el *aadA*) bajo dos promotores en tandem, *rbcL* y *Prn*.

Ejemplo No.4: Expresión de una unidad bi-cistrónica heteróloga en plantas transplastómicas de tomate (pVTPA-f-GUS-aadA).

En el vector objeto de esta invención es posible expresar varios genes en forma de una unidad policistrónica. A modo de ilustración de esta posibilidad, introdujimos a continuación del gen *gus* en el vector pVTPA-f-GUS (Ejemplo No.2) el gen *aadA* para formar una unidad tricistrónica (considerando que el gen marcador *hgh* también será expresado como parte del ARNm producido a partir del promotor *rbcL*), que después de permitir la eliminación del marcador de selección al ser obtenidas las plantas transplastómicas homoplásmicas expresará en ellas la β -glucuronidasa y la amino-glicósido adenil-transferasa.

El gen *aadA* fue amplificado mediante PCR como se describe en el Ejemplo No.3, y clonado en el sitio *ApaI* del plásmido pVTPA-f-GUS, para dar lugar al vector pVTPA-f-GUS-*aadA* (secuencia No.23). Este nuevo vector fue empleado para obtener plantas transplástomicas de tomate según la metodología descrita a continuación:

Semillas de tomate de la variedad Campbell-28 se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos, y después se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas por 12 días en el medio MSO (Sales de MS; Vitaminas B5 de Gamborg; 30 g/L Sacarosa; 8 g/L Fitoagar; pH 5.8) diluido a la mitad, y las hojas cotiledonales fueron colectadas en medio MSO líquido y cultivadas con el lado abaxial hacia abajo en una placa con medio sólido MSO + 1mg/L de zeatina con 0.4 M de manitol para un pre-tratamiento osmótico por 4h. Los microproyectiles para el bombardeo se prepararon empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m y la transformación se realiza empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por placa. Los cotiledones bombardeados se mantienen en el mismo medio iso-osmótico por 14 a 16 horas adicionales y posteriormente se pasan a medio MSO + zeatina por dos días con el lado abaxial hacia arriba. A continuación los cotiledones bombardeados se transfieren, con el lado abaxial hacia arriba, a medio MSO + zeatina con 5mg/L de Higromicina-B (Duchefa, Holanda). Los callos resistentes y brotes verdes aparecen entre las 3 y 6 semanas de cultivo; se separan del tejido muerto y se transfieren al mismo medio selectivo para un segundo ciclo de selección a concentración de 10mg/L de Higromicina-B. Después de otras 3-4 semanas, los brotes y callos resistentes se pasan para su desarrollo a medio MSO + 0.1 mg/L de zeatina (con Higromicina-B a 15 mg/L), y 3 semanas más tarde a medio MSO + higromicina para su enraizamiento. Todo el cultivo se realiza con un régimen de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La resistencia a 500 mg/L de Espectinomicina (*Spc^r*), así como la expresión del gen GUS (mediante ensayo histoquímico), fue evaluada en los clones obtenidos. Los resultados de tres experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Obtención de plantas transplastómicas de tomate con la construcción pVTPA-f-GUS-*aadA*.

Experimento	No.de cotiledones bombardeados	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones <i>Spc^r</i>	Clones GUS ⁺
I	75	6	6	6
II	100	9	9	9
III	100	7	7	7
Sumatoria	275	22	22	22

Al cultivar las plantas en tierra, no observamos diferencias fenotípicas entre nuestras plantas transplastómicas y plantas no manipuladas de tomate, por lo que confirmamos la funcionalidad de la proteínas *atpB* y *rbcL* híbridas, y la factibilidad de manipular genéticamente las mismas como vía para mejorar la actividad metabólica de los plastidios.

El presente ejemplo ilustra no solo la potencialidad del vector por nosotros desarrollado para expresar varios genes como parte de un mismo ARNm, sino además, confirma la universalidad de los vectores objeto de esta invención como vehículo para la obtención de clones transplastómicos de plantas Angiospermas diferentes de las plantas donantes de las secuencias empleadas como bordes para la integración del ADN heterólogo en el genoma de los plastidios.

Ejemplo No.5: Expresión de dos unidades transcripcionales independientes en plantas transplastómicas de tabaco (pVTPA-HB-aadA). Obtención de plantas transplastómicas que expresan un antígeno vacunal multimérico.

El gen que codifica para el antígeno de superficie de la hepatitis B (*HBsAg*) (Valenzuela P; Gray P; Quiroga M; Zaldivar J; Goodman H.M; Rutter W.J. Nature 1979, 280:815-819) se obtuvo del plásmido pSAO503 (CIGB, Cuba) mediante digestión con *EcoRI*/*Klenow* y *NcoI*, y se introdujo en el vector pVIEP-2 (ver Ejemplo No.2) digerido con *NcoI* y *SmaI*, para colocarle un sitio de unión a ribosomas ante el codón de inicio de la traducción. De esta forma obtuvimos el plásmido pVIEP-2-HB, de donde la banda de aproximadamente 820 pb conteniendo el gen que codifica para el antígeno de superficie de la hepatitis B se obtuvo mediante digestión con *XhoI* y se clonó en el vector pVTPA-aadA (ver Ejemplo No.3) digerido con *Sall*. Un clon con el gen *HBsAg* clonado en orientación correcta bajo el promotor de *rbcL* de arroz, y que además expresa los genes marcadores *aadA* e *hgh* bajo el promotor *Prm*, se denominó pVTPA-HB-aadA (Secuencia No.24).

El vector pVTPA-HB-aadA se utilizó para obtener plantas transplastómicas de tabaco que expresan el antígeno de superficie de la hepatitis B, mediante el protocolo de transformación descrito en el Ejemplo No.2. La selección de los clones transplastómicos se realizó inicialmente con Higromicina-B (10mg/L) y al final fue chequeada la resistencia de los mismos a Espectinomicina (500mg/L), y la expresión del *HBsAg* mediante un ensayo tipo ELISA específico (C.I.G.B, Cuba), y Western blot (Figura 6). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco con la construcción pVTPA-HB-aadA.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	No. de clones resistentes a Espectinomicina	No. de clones que expresan el HBsAg (por ELISA)
I	10	13	13	9
II	10	11	11	7
Sumatoria	20	24	24	16

Nuestros resultados confirman la utilidad del vector objeto de esta invención para expresar dos o más genes como unidades transcripcionales independientes en el genoma de las plantas transplastómicas. Adicionalmente, se confirma la utilidad de este vector para expresar en plastidios genes que codifican para proteínas útiles, formen estas complejos multiméricos o no. En particular logramos expresar el antígeno multimérico de superficie del virus de la hepatitis B. Es obvio que lo aquí ejemplificado es aplicable a otros antígenos vacunales, y que los mismos, una vez expresados en las células vegetales, pueden ser formulados como preparaciones capaces de inducir inmunidad contra estos patógenos al ser administradas al hombre o a animales. Otras proteínas multiméricas que pudieran ser expresadas mediante este vector serían las inmunoglobulinas.

Ejemplo No.6: Expresión de un gen heterólogo en plastidios bajo dos promotores y un minicistrón (pVTPA-GUS1-aadA y pVTPA-GUS3-aadA).

El vector intermediario para la clonación y expresión de genes en los vectores objetos de esta invención, pVIEP (ver Ejemplo No.2), permite clonar en él un gen bajo el promotor PpsbA* y un minicistrón diseñado para aumentar la estabilidad y promover la traducción de los ARNm producidos. En este vector se clonó en gen *uidA* tal y como se describe en el Ejemplo No.2 para obtener el plásmido pVIEP-GUS1.

Para comprobar la funcionalidad del minicistrón, se realizó una construcción genética en la cual el minicistrón fue eliminado del pVIEP mediante digestión NdeI + SnaBI, tratamiento con nucleasa S1 y recircularización del plasmidio para obtener el vector pVIEP-3, donde se clonó el gen *uidA* de la manera anteriormente descrita dando lugar a plásmido pVIEP-GUS3. Ambos casetes conteniendo el gen *gus* fueron obtenidos de los vectores intermediarios por digestión con HindIII y clonados en el vector pVTPA-aadA igualmente digerido. Las construcciones finalmente obtenidas que contienen el gen *gus* bajo los promotores *rbcl* de

arroz y PpsbA*, se denominaron pVTPA-GUS1-aadA y pVTPA-GUS3-aadA respectivamente, y con ellas se procedió a transformar plantas de tabaco según el protocolo descrito en el Ejemplo No.2.

Plantas transplastómicas fueron obtenidas con ambas construcciones, y se procedió a comparar los niveles de expresión GUS de 5 clones de cada una de ellas por el método fluorimétrico empleando 4-MUG según la metodología descrita por Jefferson (Jefferson R.A. Plant Mol. Biol. Rep. 1987, 5: 387-405). Los resultados se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Expresión del gen uidA en plastidios de tabaco bajo dos promotores y un minicistrón.

Construcción	Clones	Actividad GUS (pM 4-MU/min x µg de proteínas totales)	Valores medios ± DS
pVTPA-GUS1-aadA	GUS1-1.3.1	2490	2475 ± 903
	GUS1-3.2.2	1736	
	GUS1-9.1.2	4125	
	GUS1-18.1.1	957	
	GUS1-23.2.1	3068	
pVTPA-GUS3-aadA	GUS3-2.1.3	517	978 ± 300
	GUS3-7.1.1	1174	
	GUS3-11.2.1	891	
	GUS3-19.2.3	1532	
	GUS3-21.1.1	775	

Como se muestra en la tabla anterior, se obtienen altos valores de actividad GUS en ambas construcciones que expresan el gen *uidA* bajo los promotores en tandem *rbcL* de arroz y PpsbA* (promotor *psbA* modificado). Adicionalmente se evidenció que los valores promedios de la actividad GUS en las plantas transformadas con la construcción que contiene el minicistrón (pVTPA-GUS1-aadA) son significativamente superiores, por lo que se demuestra la funcionalidad de este elemento genético en los plastidios y su utilidad como herramienta que permite incrementar la expresión de los genes en estos organelos celulares.

Ejemplo No.7: Obtención de plantas transplastómicas de arroz con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA

Plantas transplastómicas de arroz fueron obtenidas de forma repetible empleando la siguiente metodología:

Se utilizan callos embriogénicos (21 días) formados en medio N6-2 (Sales y vitaminas del medio N6 (Chu C.C; y otros. Scientia Sinic1975, 18:659); 0.1g/L de mio-inositol; Hidrolizado de caseína 1 g/L; 2,4 D a 2mg/L; Sacarosa 30g/L; Fitagel 3g/L, pH 5.7) a partir de semillas maduras de arroz. Estos callos se subcultivan 5 días en medio fresco N6-2 y posteriormente se pasan a medio N6-2 con 3mg/L de kinetina por 48-72 horas en la oscuridad. Antes del bombardeo los callos se subcultivan en el mismo medio suplementado con 0.4 M de manitol para el pre- tratamiento osmótico. Para el disparo se colocan 30 callos en el centro de la placa para ser bombardeados con las siguientes condiciones (1100 psi de presión, 6cm de distancia, partículas de oro de 0.6 μ m cargadas con el plasmidio pVTPA-f-GUS-aadA y un disparo por placa). Después del disparo los callos permanecen en el mismo medio osmótico por 16h en la oscuridad y a continuación se subcultivan 2 días en medio N6-2 sin manitol en las mismas condiciones. Seguidamente, los callos son transferidos a medio N6-2 con 20 mg/L de Higromicina-B. A los 10 días, los callos capaces de crecer en presencia del antibiótico son transferidos al mismo medio fresco para un segundo ciclo de selección por 10 días. Finalmente, los callos resistentes se pasan a medio de regeneración KIBAN modificado (Sales y vitaminas del medio MS; Kinetina 3 mg/L; BAP 0.5 mg/L; NAA 1 mg/L; Maltosa 30 g/L; pH5.7; Fitagel 4.5 g/L) más 30 mg/L de Higromicina-B, y los brotes verdes de aproximadamente 2 cm obtenidos después de 3-4 semanas de cultivo en régimen de 16h luz y 8h oscuridad, se pasan a un ciclo de micropropagación en medio MS líquido modificado (Sales y vitaminas del medio MS; Sacarosa 30 g/L; BAP 5mg/L, pH 5.7) con 20mg/L de Higromicina. Los brotes se colocan en erlenmeyers con 50 ml de dicho medio y se incuban en agitación a 150 rpm a 28 °C con un foto período de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Se obtienen aproximadamente 7 brotes axilares por explante al cabo de 7 días, los cuales se pasan a enraizar en medio MS sólido más 30 g/L de Sacarosa y 30 mg/L de Higromicina-B.

En los clones trasplastómicos obtenidos se evaluó la resistencia a Espectinomicina (a 500 mg/L), así como la expresión del gen *gus* (mediante ensayo histoquímico). Adicionalmente se comprobó que el pre-tratamiento de las células a bombardear con citoquininas, aumenta significativamente la frecuencia de obtención de plantas trasplastómicas. Los resultados de estos experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla 7:

Tabla 7. Obtención de plantas trasplastómicas de arroz (var. IAC-28) con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA con y sin emplear pre-tratamiento con citoquininas (kinetina a 3 mg/L).

Experimento	No.de placas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones Spc ^r	Clones GUS ⁺
I	10	2	2	2
II	10	1	1	1
III + Kinetina	10	7	7	7
IV + Kinetina	10	8	8	8

El presente ejemplo confirma mediante la transformación de una especie monocotiledónea, la universalidad y funcionalidad de los vectores objetos de esta invención.

Ejemplo No.8: Obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA.

La obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar se realizó según el siguiente protocolo:

Se toman los cogollos de plantas de campo de caña de azúcar (var. Ja60-5) de 6 meses de edad, se desinfectan con etanol al 70% por 1 minuto y luego por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10%, se lavan abundantemente con agua destilada estéril. Se aislan segmentos de 0.5x1cm de la base de las hojas jóvenes y se cultivan a la luz en medio sólido P+5 (100mg/L de mio-Inositol; 500mg/L de Hidrolisado de caseína; Sales y Vitaminas MS; Sacarosa 20g/L; 5mg/L de 2,4D; Fitagel 4g/L; pH 5.7) con 3 mg/L de kinetina por 48 horas, seguido de un cultivo en el mismo medio con 0.4 M de Manitol por 6-8h, a la luz. Se bombardea empleando partículas esféricas de oro de 0.6 μ m cargadas con el plásmido pVTPA-f-GUS-aadA, empleando el sistema PDS-1000/He de Biorad a una presión de 1100 psi, una distancia de disparo de 6 cm y un disparo por hoja. Los explantes bombardeados se mantienen en el medio P+5 iso-osmótico por 24 horas adicionales a la oscuridad, y posteriormente se pasan a medio P+5 por dos días, para después continuar su cultivo a la oscuridad en medio P+5 con Higromicina-B a 15mg/L. Callos resistentes a Higromicina aparecen a las 4 semanas de cultivo y se pasan a regenerar a la luz en medio sólido P- (igual al P+5 pero sin 2,4D) con Higromicina-B. Los brotes regenerados se individualizan después de 4-6 semanas de cultivo y se pasan a enraizar en medio P- con el agente selectivo a 20 mg/L.

La resistencia a Espectinomicina (a 500 mg/L), así como la expresión del gen *gus* (mediante ensayo histoquímico), fue evaluada en los clones obtenidos. Los resultados de dos experimentos de transformación se muestran en la siguiente tabla 8:

Tabla 8. Obtención de plantas transplastómicas de caña de azúcar con la construcción pVTPA-f-GUS-aadA.

Experimento	No.de explantes bombardeados	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones Sp ^c ^r	Clones GUS ⁺
I	20	11	11	11
II	20	7	7	7

El presente ejemplo confirma nuevamente, esta vez mediante la transformación de una especie monocotiledónea, la universalidad de los vectores objetos de esta invención como vehículo para la obtención de clones transplastómicos de plantas Angiospermas diferentes de las plantas donantes de las secuencias empleadas como bordes para la integración del ADN heterólogo en el genoma de los plastidios.

Ejemplo No.9. Obtención de plantas transplastómicas con caracteres agronómicos deseables. La obtención de plantas transplastómicas con nuevos caracteres agronómicos incorporados es fundamental para la lucha contra enfermedades, plagas y malezas, el incremento de los rendimientos, la disminución de los costos y mejores cualidades de los productos, sin que exista el peligro de que escapen al ambiente de los nuevos genes introducidos.

El gen *pat* (*bar*) de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson C.J; Movva N.R; Tizard R; Crameri R; Davies J.E; y otros. EMBO Journal 1987, 6:2519-2523) que codifica para la fosfinotricina (ingrediente activo del herbicida BASTATM) acetil transferasasa, fue obtenido a partir del plásmido pBS-Bar (C.I.G.B.) mediante digestión XbaI/S1 nucleasa y BamHI y se clonó en el vector pVIEP-2 (Ejemplo No.2) digerido con NcoI/ S1 nucleasa y BamHI, para obtener el plásmido pVIEP2-Bar que fue posteriormente digerido con XhoI, y el fragmento de ADN de aproximadamente 670 pb conteniendo el gen *pat* con un RBS se insertó en el vector pVTPA digerido con XhoI para obtener la construcción pVTPA-Bar (secuencia No.25). Las plantas transplastómicas de tabaco fueron obtenidas según la metodología descrita en el Ejemplo No.2 realizando la selección con 5 mg/L de fosfinotricin (Duchefa, Holanda) en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 9.

Tabla 9. Obtención de plantas transplastómicas de tabaco resistentes a herbicida con la construcción pVTPA-Bar.

Experimento	No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a fosfinotricin (5mg/L)
I	10	13
II	10	14
Control transformado sin plásmido	10	0

Es obvio que el clonaje y expresión en los vectores objeto de esta invención de otros genes que confieran resistencia a herbicidas, como el glifosato, asulam, sulfonilureas, imidazolinonas y bromoxinil, por ejemplo, producirán plantas transplastómicas resistentes a estos productos químicos. Igualmente, es obvio que con el empleo del vector objeto de esta invención es factible introducir y expresar en las plantas transplastómicas genes que confieran resistencia a plagas y enfermedades, como por ejemplo los genes que codifican para los cristales proteicos entomocidas de *Bacillus thuringiensis*; o para proteínas con actividad antimicrobiana como quitinasas y glucanasas; o anti-stress abióticos como colina oxidasa. La modificación o introducción de genes que aumenten la eficiencia del proceso fotosintético, o la calidad de los productos vegetales, son otras de las muchas acciones factibles de realizar con el empleo del vector universal para la transformación de plastidios de Angiospermas que aquí se propone.

Ejemplo No.10: Expresión de proteínas de utilidad no agronómica en plastidios.

En el Ejemplo No.5 demostramos la utilidad del vector que aquí proponemos para establemente introducir y expresar en plastidios de plantas Angiospermas genes que codifican para proteínas multiméricas. Otras proteínas de uso médico, veterinario o industrial son igualmente factibles de ser producidas en plantas transplastómicas mediante el empleo de nuestro sistema de vectores de transformación/expresión.

Para expresar en cloroplastos el agente fibrinolítico estreptoquinasa, de gran utilidad terapéutica para el tratamiento de trombosis e infartos del miocardio, el fragmento de ADN de 1254 pb que codifica para la proteína madura SKC-2 de *Streptococcus* fue escindido del vector pEKG-3 (Estrada M.P; Hernández L; Pérez A; Rodríguez P; Serrano R; Rubiera R; Pedraza A; y otros. Bio/Technology 1992, 10:1138-1142) mediante digestión con EcoRI, tratamiento con nucleasa S1 y finalmente digestión con BamHI, e insertado en el vector intermediario pVIEP (ver Ejemplo No.2) previamente digerido con NcoI, tratado con S1 nucleasa y digerido con BamHI. A partir del plásmido obtenido, pVIEP-Estrep, se obtuvo por digestión SalI + XhoI el casete para la expresión del gen de la estreptoquinasa en plastidios bajo el promotor PpsbA* y el minicistrón; este casete se clonó en el vector pVTPA (ver Ejemplo No.1) digerido con SalI y XhoI para obtener el plasmidio pVTPA-Estrep (Secuencia No.26).

Con el vector pVTPA-Estrep se procedió a transformar plantas de tabaco según el protocolo descrito en el Ejemplo No.2, los resultados se muestran en la tabla 10 (la actividad fibrinolítica de la estreptoquinasa producida en un grupo de clones se determinó mediante la

Técnica de placa caseína/plasminógeno (Estrada M.P; Hernández L; Pérez A; Rodríguez P; Serrano R; Rubiera R; Pedraza A; y otros. Bio/Technology 1992, 10:1138-1142).

Tabla 10. Expresión de Estreptoquinasa en plastidios de tabaco.

No.de hojas bombardeadas	No. de clones resistentes a Higromicina	Clones	Actividad fibrinolítica (UI/mg de proteínas)
10	14	Strep2.3.1	650
		Strep4.5.2	400
		Strep5.2.2	1500
		Strep9.2.2	200
		Strep12.3.1	350
		Control negativo	0

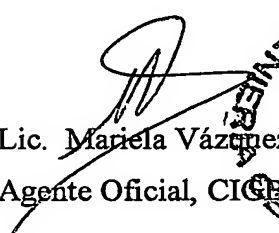
Estos resultados confirman la utilidad de los vectores objeto de esta invención para expresar en plastidios genes que codifican para proteínas útiles, y en particular proteínas de uso farmacéutico o veterinario como trombolíticos, interferones, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, antígenos, receptores celulares u otras. Es obvio que lo aquí ejemplificado es aplicable también a la expresión en plastidios, empleando los vectores de transformación/expresión descritos en el presente documento, de otros tipos de enzimas y proteínas de uso industrial como lipasas, proteasas, etc.

Ejemplo No.11: Expresión de inmunoglobulinas en plastidios.

El fragmento de ADN que codifica para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal CB-Hep.1 específico contra el HBsAg fueron obtenidas mediante digestión NcoI – XbaI de los plasmidios pHESΩHBsAgCL y pHESΩHBsAgCH (Nadia Ramírez, “Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transgénico: un sistema para la producción de un anticuerpo anti-HBsAg y de sus fragmentos”, Tesis de doctorado, C.I.G.B., 2002) e insertadas en el vector pVIEP digerido con estas mismas enzimas para obtener los plásmidos pVIEP-Hc y pVIEP-Lc. A continuación, el fragmento que codifica para la cadena ligera fue escindido del pVIEP-Lc mediante digestión SnaBI – BamHI, e insertado a continuación del que codifica para la cadena pesada en el plásmido pVIEP-Hc por digestión con SmaI – BamHI, para obtener la construcción bicistrónica pVIEP-HcLc, de donde ambos genes fueron finalmente introducidos en el vector para la transformación de plastidios de Angiospermas pVTPA-f mediante digestión HindIII; así, después de buscar el clon con la orientación correcta, se obtuvo el plásmido pVTPA-HcLc que fue introducido a plastidios de tabaco al igual que se describió en el Ejemplo No.2.

Las plantas transplastómicas obtenidas fueron analizadas por Western blot para detectar la presencia de ambas cadenas del anticuerpo CB-Hep.1 (Figura 7), y adicionalmente se demostró la funcionalidad de la inmunoglobulina recombinante obtenida empleando un extracto de las plantas transplastómicas para detectar la presencia del HBsAg en un ELISA que se reveló con un policlonal de conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina.

De esta forma, a la vez que demostramos la posibilidad de obtener con nuestros vectores de transformación/expresión anticuerpos completamente funcionales en las plantas transplastómicas, reafirmamos la posibilidad de expresar y ensamblar correctamente proteínas multiméricas en plástidos.


Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS.

<130> Vector para plastidios de Angiospermas

<140> 0000

<141> 2002-08-05

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido correspondiente a la región -291 a
-270 (a partir de inicio de traducción) del gen
que codifica para la rbcL de tabaco.

<400> 1
gggaagttct tattatttag g 21

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido correspondiente a la región +1213
a +1233 (a partir de inicio de traducción) del gen
que codifica para la rbcL de tabaco.

<400> 2
ccaaggatgt cctaaagttc 20

<210> 3

<211> 133

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento
sintético de ADN correspondiente a la región -162
a -29 del líder no traducible del gen rbcL de
tabaco, con secuencia del lacO "ideal" insertada.

<400> 3
ccatggtcta ataatacaaac attctgatta gttgataatt caaattgtga gcgctcacaa 60
tttgaaagat tcctgtgaaa agtttcatta acacggaatt cgtgtcgagt agaccttggt 120
gttgtagaa ttc 133

<210> 4
 <211> 1523
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica del borde-rbcL de tabaco.

<400> 4
 gggaagttct tattattttag gttagtcagg tatttccatt tcaaaaaaaaa aaaaagtaaa 60
 aaagaaaaat tgggttgccg tatatatatg aaagagtata caataatgat gtatttggca 120
 aatcaaatac catggtctaa taatcaaaca ttctgattag ttgataattc aaattgtgag 180
 cgctcacaat ttgaaagatt cctgtgaaaa gtttcattaa cacggaattc gtgtcgagta 240
 gacctgtgtg ttgtgagaat tcttaattca tgagttgtag ggagggattt atgtcaccac 300
 aaacagagac taaagcaagt gttggattca aagctggtgt taaagagtac aaattgactt 360
 attatactcc tgagtaccaa accaaggata ctgatataatt ggcagcattc cgagtaactc 420
 ctcaacctgg agttccacct gaagaagcag gggccgcggt agctgccgaa tcttctactg 480
 gtacatggac aactgtatgg accgatggac ttaccagcct tgatcgttac aaagggcgat 540
 gctaccgcat cgagcgtggt gttggagaaa aagatcaata tattgcttat gtagcttacc 600
 ctttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ccaacatggt tacttccatt gtaggtaacg 660
 tatttgggtt caaagccctg cgcgctctac gtctggaaga tctgcgaatc cctcctgctt 720
 atgttaaaac tttccaaggt ccgcctcatg ggatccaagt tgaaagagat aaattgaaca 780
 agtatggctg tcccctgttg ggatgtacta ttaaacctaa attgggggta tctgctaaaa 840
 actacggtag agccgtttat gaatgtcttc gcggtggact tgattttact aaagatgatg 900
 agaacgtgaa ctcaacaacca tttatgcggt ggagagatcg tttcttattt tgtgccgaag 960
 cactttataa agcacagggt gaaacagggt aaatcaaagg gcattacttg aatgctactg 1020
 caggtacatg cgaagaaatg atcaaaagag ctgtatttgc tagagaattg ggcgttccga 1080
 tcgtaatgca tgactactta acggggggat tcaccgcaaa tactagcttg gctcattatt 1140
 gccgagataa tgggtctactt cttcacatcc accgtgcaat gcatgcggtt attgatagac 1200
 agaagaatca tgggtatccac ttccgggtat tagcaaaagc gttacgtatg tctgggtggag 1260
 atcatattca ctctggtacc gtagtaggta aacttgaagg tgaaagagac ataacttttg 1320
 gctttgttga tttactgcgt gatgattttg ttgaacaaga tcgaagtcgc ggtattttatt 1380
 tcaactcaaga ttgggtctct ttaccagggt ttctaccggt ggcttcagga ggtattcacg 1440
 tttggcatat gcctgctctg accgagatct ttggggatga ttccgtacta cagttcgggtg 1500
 gaggaacttt aggacatcct tgg 1523

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido correspondiente a la región -543 a
 -519 (a partir de inicio de traducción) del gen
 que codifica para la atpB de arroz.

<400> 5
 gacttgagtt gttgttattg taag

24

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido correspondiente a la región +1188
 a +1211 (a partir de inicio de traducción) del
 gen que codifica para la atpB de arroz.

<400> 6
 atgtcctgaa gttctttgta acg

23

<210> 7
 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento
 sintético de ADN correspondiente a la región -654
 a -543 del líder no traducible del gen atpB de
 arroz, más sitios de restricción adicionados.

<400> 7
 aagcttggcc aaaaaggccg tcgacaaaat ggggggcatg ctttaagttaa tgaatatggt 60
 tcattcatat aatatgtttc attcatatat aatgggtaca ccctgtgtac attctatgct 120
 ataggaattc at 132

<210> 8
 <211> 1887
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
 nucleotídica del borde-atpB de arroz.

<400> 8
 aagcttggcc aaaaaggccg tcgacaaaat ggggggcatg ctttaagttaa tgaatatggt 60
 tcattcatat aatatgtttc attcatatat aatgggtaca ccctgtgtac attctatgct 120
 ataggaattc attcgacttg agttgttgtt attgtaagtt aacatgcttc gattattaaa 180
 ccattggattt gattcaccaa atccatcttt attgtatact ctttaataga tatagcgcaa 240
 ccccaaatca acttctaate cttattaaagt tcttaataga ccccttttctc ttattttgag 300
 tggaaatacc taaatactac gaaaattctc tgttgacagc aatctatgct tcacagtagt 360
 atatattttg tatatcgaag tcctagataa gaaagtagag taggcacaaa tcgtttacaa 420
 aaggcaaaat gtatatgaaa aaaagattga ttgaactttc cgacggactc attccatgag 480
 taaacgattg aatgggattc gtttgggcaa cgaaatcaag tgctgggtccc cttttctctc 540
 ttattgaatt aactaattca tttccttttg acttttggat ttttggatat ttttttgggtg 600
 ttgatttggc attattcaac aagaaaaaaa tcaaaatttc gataaattcc ttttttttga 660
 aaattatgtg ataattatga gaaccaatcc tactacttct cgtcccgggg tttctacaat 720
 tgaagaaaaa agtacagggc gtatcgatca aattattgga cccgtgctgg atgtcaactt 780
 tccccgggc aagttacctt atatttataa tgctttggtg gtcaagagtc gagacactga 840
 cggttaagcaa attaatgtaa cttgtgaggt acaacaatta ttaggaaata atcgagttag 900
 agctgtagct atgagtgtca cagatgggtt gatgagagga atggaagtga ttgacacggg 960
 agtcctctctc agtggttctg tcggtggagc tactcttgga cgaattttca acgttcttgg 1020
 ggagcctgtt gacaattttg gtcctgtaga tactagtgtc acattcccta ttcatagatc 1080
 cgcgcccgcc tttatcgagt tagatacgaa attatccatc tttgaaactg gtattaaggt 1140
 ggtcgatctt ttagctcctt atcggcgtgg aggaaaaatc ggactatttg ggggagctgg 1200
 agtaggtaaa acagtactca tcatggaatt aatcaacaat attgctaaag ctacacgggg 1260
 cgtatccgta tttggcggag taggggaacg gactcgtgaa ggaaatgatc tttatatgga 1320
 aatgaaggaa tctggagtaa ttaatgaaaa aaatcttgag gaatcaaagg tagctctagt 1380
 ctatggccaa atgaatgaac cgccaggagc tcgtatgaga gttgggttga ctgccctaac 1440
 tatggcagaa tatttccgag atgttaataa gcaagacgtg cttctattca tcgataatat 1500

```

ctttcggtttt gttcaagcag gatcggaggt atctgcctta ttagggagaa tgccctctgc 1560
agtgggttat caacctactc ttagtacaga aatgggttct ttgcaagaaa gaattacttc 1620
tactaaaaag ggatctataa cttcgatcca agcgggtttat gtacctgcgg acgatttgac 1680
cgaccctgct cctgctacaa catttgaca tttggatgct actaccgtac tttccagagg 1740
attagcttcc aaagggtttt atcctgcagt agatccttta gattcaacct caactatggt 1800
acaacctcgg atcgttggca acgaacatta tgaaactgca caaagagtta agcaaaactt 1860
acaacgttac aaagaacttc aggacat 1887

```

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
hgh (con secuencia tipo Shine-Dalgarno
incorporada).

<400> 9

gggaggaatg agatatgaaa aagc

24

<210> 10

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
hgh.

<400> 10

gtcgttacct actctatttc tttg

24

<210> 11

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento
sintético de ADN con sitios de clonaje HindIII,
MluI, ApaI, SmaI y BglII, necesarios para la
construcción del casete de selección con el gen
hgh.

<400> 11

aagcttgatt cgagtgaacg cgtatagggc ccgggagatc t

41

<210> 12

<211> 2223

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia

nucleotídica del fragmento de ADN con el casete de selección con bordes repetidos (linker-spacer-Hyg-spacer-rrnT1T2) clonado en el pBluescript.

<400> 12

```

aagcttgatt cgagtgaacg cgtatagggc ccaattcgag ctcggtacca gcaccaccag 60
cggtagggtg cggaacttct acaacctcaa agcccataac gttgcggata gaacccttct 120
caggggtcaat cagagcagcg tagtttgctg cgttcggcat cagtgcgtcc agaatcgag 180
agtagctatc tgggtcacag tagaacacac ggtagcagc cggaacatag ttcttgggtca 240
gagccgcacg agccttagtc agagccgcaa taatctcctt acccagcgca acttgggtcgg 300
tcaagtgcgg ccttggtctg agtgggtctca attacggtag cagtacctaa gccctcgggg 360
gatctgggga ggaatgagat atgaaaaagc ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt 420
ttctgatcga aaagttagac agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcaagaat 480
ctcgtgcttt cagcttcgat gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg 540
ccgatggttt ctacaaagat cgttatgttt atcggcactt tgcacggcc gcgctcccga 600
ttccggaagt gcttgacatt ggggagttta gcgagagcct gacctattgc atctcccgc 660
gtgcacaggg tgtagcgtt caagacctgc ctgaaaccga actgcccgt gttctacaac 720
cggtcgcgga ggctatggat gcgtagcgtg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg 780
gccattcgg accgcaagga atcgggtcaa acactacatg gcgtgatttc atatgcgcga 840
ttgctgatcc ccatgtgtat cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg 900
tcgcgaggc tctcgatgag ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc 960
tcgtgcacgc ggatttcggc tccaacaatg tctgacgga caatggccgc ataacagcgg 1020
tcattgactg gagcgaggcg atgttcgggg attcccaata cgaggtcgcc aacatcttct 1080
tctggaggcc gtggttggct tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc 1140
cggagcttgc aggatcgcca cgactccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac 1200
tctatcagag cttggttgac ggcaatttcg atgatgcagc ttgggcgagc ggtcgatgcg 1260
acgcaatcgt ccgatccgga gccgggactg tcgggcgtac acaaatcgcc cgcagaagcg 1320
cggccgtctg gaccgatggc tgtgtagaag tactcgccga tagtggaac cgacgcccc 1380
gcactcgtcc gagggcaaag aaatagagta ggtaccagca ccaccagcgg tgaggtgcgg 1440
aacttctaca acctcaaagc ccataacggt gcggatagaa cccttctcag ggtcaatcag 1500
agcagcgtag tttgctgcgt tcggcatcag tgctgccaga atcgagagc agctatctgg 1560
gtcacagtag aacacacggt cagcagccgg aacatagttc ttggtcagag ccgcacgagc 1620
cttagtcaga gccgcaataa tctccttacc cagcgcaact tggtcggtaa gtgcggcctt 1680
gttctgagtg gtctcaatta cggtagcagt acctaaagccc tcgggggatc agcttggctg 1740
ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg 1800
tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc 1860
gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgccga tggtagtgtg gggctctccc atgcgagagt 1920
agggaaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggtcagtc gaaagactgg gcctttcggt 1980
ttatctgttg tttgtcgggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc ggagcggatt 2040
tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggccggcgag acgcccgcga taaactgcc 2100
ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc 2160
ttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctgggggatc cactagttct 2220
aga 2223

```

<210> 13

<211> 5669

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-f entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 13

```

gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcggtgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat cccttgga gctaactctc tggaaagtac ggtagtagca 180

```

tccaaatgtg	caaatgttgt	agcaggagca	gggtcgggtca	aatcgtccgc	aggtacataa	240
accgcttgga	tcgaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaagaa	300
cccattttctg	tactaagagt	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
gcagataacct	ccgatcctgc	ttgaacaaaa	cgaaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcaa	accaactctc	480
atacgagctc	ctggcggttc	attcatttgg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
cgagtccgtt	cccctactcc	gccaaatacg	gatacgcccc	cgtgagcttt	agcaatattg	660
ttgattaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctccccaaa	tagtccgatt	720
tttcctccac	gccgataaag	agctaaaaga	tcgaccacct	taataccagt	ttcaaagatg	780
gataatttctg	tatctaaactc	gataaaggcg	ggcgcggtac	tatgaatagg	gaatgttgca	840
ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctccccaa	gaacgttgaa	aattcgtcca	900
agagtagctc	caccgcagag	aacactgaga	ggagctcccg	tgtcaatcac	ttccattcct	960
ctcatcaacc	catctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
tggtgtacct	cacaagttac	attaatttgc	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
aaagcattat	aaatataagg	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaacccc	gggacgagaa	1200
gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
ttttgatttt	tttcttgttg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
aaaagtcaaa	aggaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcggaaa	1440
gttcaatcaa	tctttttttc	atatacattt	tgctttttgt	aaacgatttg	tgctactctc	1500
actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
tcaacagaga	attttcgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	aggggttcta	1620
ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttggggttgc	gctatatcta	ttaaagagta	1680
tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
ccatttatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgtcgacggc	cttttttgcc	aagcttgatt	cgagtgaacg	cgtatagggc	1920
ccaattcgag	ctcggtagca	gcaccaccag	cggtagggtg	cggaaacttct	acaacctcaa	1980
agcccataac	gttcgggata	gaacccttct	cagggtcaat	cagagcagcg	tagtttgctg	2040
cgttcggcat	cagtgcgtcc	agaatcgcat	agtagctatc	tgggtcacag	tagaacacac	2100
ggtcagcagc	cggaacatag	ttcttggtca	gagccgcacg	agccttagtc	agagccgcaa	2160
taatctcctt	accagcgca	acttggtcgg	tcaagtgcgg	ccttgttctg	agtgggtctca	2220
attacggtag	cagtacctaa	gccctcgggg	gatctgggga	ggaatgagat	atgaaaaagc	2280
ctgaactcac	cgcgacgtct	gtcgagaagt	ttctgatcga	aaagttcgac	agcgtctccg	2340
acctgatgca	gctctcggag	ggcgaagaat	ctcgtgcttt	cagcttcgat	gtaggagggc	2400
gtggatatgt	cctgcgggta	aatagctcgg	ccgatggttt	ctacaaagat	cgttatgttt	2460
atcggcactt	tgcctcggcc	gcgctcccca	ttccggaagt	gcttgacatt	ggggagttaa	2520
cgagagccct	gacctattgc	atctcccgcc	gtgcacaggg	tgtcacgttg	caagacctgc	2580
ctgaaaccga	actgccgct	gttctacaac	cggtcgcgga	ggctatggat	gcgatcgctg	2640
cggccgatct	tagccagacg	agcgggttcg	gccatttcgg	accgcaagga	atcgggtcaat	2700
acactacatg	gcgtgatttc	atatgcgcga	ttgctgatcc	ccatgtgtat	cactggcaaa	2760
ctgtgatgga	cgacaccgtc	agtgcgtccg	tcgcgcaggc	tctcgatgag	ctgatgcttt	2820
gggcccagga	ctgccccgaa	gtccggcacc	tcgtgcacgc	ggatttcggc	tccaacaatg	2880
tcctgacgga	caatggccgc	ataacagcgg	tcattgactg	gagcgaggcg	atgttcgggg	2940
attcccaata	cgaggtcgcc	aacatcttct	tctggaggcc	gtggttggtc	tgtatggagc	3000
agcagacgcg	ctacttcgag	cggaggcatc	cggagcttgc	aggatcgcca	cgactccggg	3060
cgtatatgct	ccgcattggg	cttgaccaac	tctatcagag	cttggttgac	ggcaatttctg	3120
atgatgcagc	ttgggcgcag	ggtcgatgcg	acgcaatcgt	ccgatccgga	gccgggactg	3180
tcggggcgtac	acaaatcgcc	cgcagaagcg	cggccgtctg	gaccgatggc	tgtgtagaag	3240
tactcgccga	tagtggaaac	cgacgcccc	gcactcgtcc	gagggcaaag	aaatagagta	3300
ggtaccagca	ccaccagcgg	tgaggtgcgg	aacttctaca	acctcaaagc	ccataacggt	3360
gcggatagaa	cccttctcag	ggtcaatcag	agcagcgtag	tttgctgcgt	tcggcatcag	3420
tgctgccaga	atcgcagagt	agctatctgg	gtcacagtag	aacacacggt	cagcagccgg	3480
aacatagttc	ttggtcagag	ccgcacgagc	cttagtcaga	gccgcaataa	tctccttacc	3540
cagcgcaacc	tggtcggtaa	gtgcggcctt	gttctgagtg	gtctcaatta	cggtagcagt	3600
acctaagccc	tcgggggatc	agcttggtcg	ttttggcgga	tgagagaaga	ttttcagcct	3660
gatacagatt	aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	cagaatttgc	ctggcggcag	3720
tagcgcggtg	gtcccacctg	accccatgcc	gaactcagaa	gtgaaacgcc	gtagcgccga	3780
tggtagtgtg	gggtctcccc	atgcgagagt	agggaaactgc	caggcatcaa	ataaaacgaa	3840

```

aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt ttatctgttg tttgtcgggtg aacgctctcc 3900
tgagtaggac aaatccgccc ggagcgggatt tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggg 3960
ggcggggcagg acgcccgcga taaactgccca ggcatacaaat taagcagaag gccatcctga 4020
cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa 4080
tatgtatccg ctgggggagtc agcttgatgg ccgccagtgt gatggatggg aagttcttat 4140
tatttaggtt agtcagggtat ttccatttca aaaaaaaaaa aagtaaaaaa gaaaaattgg 4200
gttgcgctat atatatgaaa gagtatacaa taatgatgta tttggcaaat caaataccat 4260
gggtctaataa tcaaacattc tgattagttg ataattcaaa ttgtgagcgc tcacaatttg 4320
aaagattcct gtgaaaagtt tcattaacac ggaattcgtg tcgagtagac cttgttggttg 4380
tgagaattct taattcatga gttgtaggga gggatttatg tcaccacaaa cagagactaa 4440
agcaagtgtt ggattcaaaag ctggtgttaa agagtacaaa ttgacttatt atactcctga 4500
gtaccaaaccc aaggatactg atatatggc agcattccga gtaactcctc aacctggagt 4560
tccacctgaa gaagcagggg ccgcggtagc tgccgaatct tctactggta catggacaac 4620
tgtatggacc gatggactta ccagccttga tcgttacaaa gggcgatgct accgcacga 4680
gcgtgttgtt ggagaaaaag atcaatatat tgcttatgta gcttaccctt tagacctttt 4740
tgaagaaggt tctgttacca acatgtttac ttccattgta ggtaacgtat ttgggttcaa 4800
agccctgcgc gctctacgtc tggaagatct gcgaatccct cctgcttatg ttaaaacttt 4860
ccaaggtccg cctcatggga tccaagttga aagagataaa ttgaacaagt atggtcgtcc 4920
cctgttggga tgtactatta aacctaaatt ggggttatct gctaaaaact acggtagagc 4980
cgtttatgaa tgtcttcgcg gtggacttga ttttactaaa gatgatgaga acgtgaactc 5040
acaaccattt atgcgttggg gagatcggtt cttattttgt gccgaagcac tttataaagc 5100
acaggctgaa acaggtgaaa tcaaagggca ttacttgaat gctactgcag gtacatgcga 5160
agaaatgatc aaaagagctg tatttgctag agaattgggc gttccgatcg taatgcata 5220
ctacttaacg gggggattca ccgcaaatac tagcttggct cattattgcc gagataatgg 5280
tctacttctt cacatccacc gtgcaatgca tgcggttatt gatagacaga agaatcatgg 5340
tatccacttc cgggtattag caaaagcgtt acgtatgtct ggtggagatc atattcactc 5400
tggtaccgta gtaggtaaac ttgaaggtga aagagacata actttgggct ttgttgattt 5460
actgcgtgat gattttgttg aacaagatcg aagtcgcggg atttatttca ctcaagattg 5520
gggtctctta ccaggtgttc taccctggc ttcaggagggt attcacgttt ggcataatgcc 5580
tgctctgacc gagatctttg gggatgattc cgtactacag ttcggtggag gaacttttagg 5640
acatccttgg atctgcagct agttctaga 5669

```

<210> 14
 <211> 176
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento sintético de ADN que codifica para la región promotora de la subunidad 16S del RNA ribosomal plastídico (Prn) con sitios de restricción adicionados.

```

<400> 14
gaattccccc gggctgctcc ccgcccgtcg ttcaatgaga atggataaga ggctcgtggg 60
attgacgtga gggggcaggg atggctatat ttctgggagc gaactccggg cgaatacgaa 120
gcgcttggat acagttgtag ggagggattt catcgtttaa actcgagtga acgcgt 176

```

<210> 15
 <211> 5834
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 15

gtcgaggtca	tgctcctgaag	ttctttgttaa	cgttgttaaag	tttgcttaac	tctttgtgca	60
gtttcataat	gttcgttgcc	aacgatccga	ggttgttaaca	tagttgaggt	tgaatctaaa	120
ggatctactg	caggataaat	ccctttggaa	gctaatacctc	tggaaagtac	ggtagtagca	180
tccaaatgtg	caaagtgtgt	agcaggagca	gggtcggtca	aatcgtccgc	aggtagcataa	240
accgcttgga	tcgaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaagaa	300
cccattttctg	tactaagagt	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
gcagatacct	ccgatcctgc	ttgaacaaaa	cgaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcaa	accaactctc	480
atacgagctc	ctggcggttc	attcatttgg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
cgagtccgtt	cccctactcc	gccaaatacg	gatacgcccc	cgtagacttt	agcaatattg	660
ttgattaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctcccccaaa	tagtccgatt	720
tttctccac	gccgataagg	agctaaaaga	tcgaccacct	taataccagt	ttcaaagatg	780
gataattttcg	tatctaactc	gataaaggcg	ggcgcggtac	tatgaatagg	gaatgttgca	840
ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctccccaa	gaacgttgaa	aattcgtcca	900
agagtagctc	caccgacagg	aacactgaga	ggagctcccc	tgtcaatcac	ttccattcct	960
ctcatcaacc	catctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
tgttgtacct	cacaagttac	attaatttgc	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
aaagcattat	aaatataagg	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaacccc	gggacgagaa	1200
gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
ttttgatttt	tttcttgttg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcggaaa	1440
gttcaatcaa	tctttttttc	atatacat	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
tcaacagaga	attttcgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	agggggtcta	1620
ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggttg	gctatatcta	ttaaagagta	1680
tacaataaag	atggattttg	tgaatcaaat	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
ccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgtcgacggc	ctttttggcc	aagcttgata	tcgaattccc	ccgggctgct	1920
cccccgccgt	cgttcaatga	gaatggataa	gaggctcggt	ggattgacgt	gagggggcag	1980
ggatggctat	atttctggga	gcgaactccg	ggcgaatacg	aagcgcttgg	atacagttgt	2040
aggagggat	ttcatcgttt	aaactcgagt	gaacgcgtat	agggcccaat	tcgagctcgg	2100
taccagcacc	accagcggtg	aggtgcggaa	cttctacaac	ctcaaagccc	ataacgttgc	2160
ggatagaacc	cttctcaggg	tcaatcagag	cagcgtagtt	tgctgcgttc	ggcatcagtg	2220
ctgccagaat	cgcagagtag	ctatctgggt	cacagtagaa	cacacggtca	gcagccggaa	2280
catagttctt	ggtcagagcc	gcacgagcct	tagtcagagc	cgcaataatc	tccttaccca	2340
gcgcaacttg	gtcgggcaag	tgcggccttg	ttctgagtgg	tctcaattac	ggtagcagta	2400
cctaagccct	cgggggatct	ggggaggaat	gagatatgaa	aaagcctgaa	ctcacccgga	2460
cgtctgtcga	gaagtttctg	atcgaaaagt	tcgacagcgt	ctccgacctg	atgcagctct	2520
cggagggcga	agaatctcgt	gctttcagct	tcgatgtagg	agggcggtgga	tatgtcctgc	2580
gggtaaatag	ctgcgcgat	ggtttctaca	aagatcggtta	tgtttatcgg	cactttgcat	2640
cggccgcgct	cccgattccg	gaagtgcctg	acattgggga	gtttagcgag	agcctgacct	2700
attgcatctc	ccgcggtgca	cagggtgtca	cgttgcaaga	cctgcctgaa	accgaactgc	2760
ccgctgttct	acaaccgggtc	gcggaggcta	tggatgcgat	cgctgcggcc	gatcttagcg	2820
agacgagcgg	gttcggccca	ttcggaccgc	aaggaatcgg	tcaatacact	acatggcggt	2880
atttcatatg	cgcgattgct	gatccccactg	tgtatcactg	gcaaactgtg	atggacgaca	2940
ccgtcagtg	gtccgtcgcg	caggctctcg	atgagctgat	gctttgggcc	gaggactgcc	3000
ccgaagtccg	gcacctcggt	cacgcggatt	tcggctccaa	caatgtcctg	acggacaatg	3060
gccgcataac	agcggtcatt	gactggagcg	aggcgatgtt	cggggattcc	caatacgagg	3120
tcgccaacat	cttcttctgg	aggccgtggt	tggcttgat	ggagcagcag	acgcgctact	3180
tcgagcggag	gcatccggag	cttgaggat	cgccacgact	ccgggcgtat	atgctccgca	3240
ttggtcttga	ccaactctat	cagagcttgg	ttgacggcaa	tttcgatgat	gcagcttggg	3300
cgcaggtcgc	atgcgacgca	atcgtccgat	ccggagccgg	gactgtcggg	cgtacacaaa	3360
tcgcccgcgc	aagcgcggcc	gtctggaccg	atggctgtgt	agaagtactc	gccgatagtg	3420
gaaaccgacg	cccagcact	cgtccgaggg	caaagaaata	gagtaggtac	cagcaccacc	3480
agcgggtgagg	tgccggaactt	ctacaacctc	aaagcccata	acgttgcgga	tagaaccctt	3540

```

ctcaggggtca atcagagcag cgtagtttgc tgcgttcggc atcagtgctg ccagaatcgc 3600
agagtagcta tctgggtcac agtagaacac acggtcagca gccggaacat agttcttggg 3660
cagagccgca cgagccttag tcagagccgc aataatctcc ttacccagcg caacttgggtc 3720
ggtaagtgcg gccttggtct gagtgggtctc aattacggta gcagtaccta agccctcggg 3780
ggatcagctt ggctgttttg gcggtgaga gaagattttc agcctgatac agattaaatc 3840
agaacgcaga agcgggtctga taaaacagaa tttgcctggc gccagtagcg cgggtggccc 3900
acctgacccc atgccgaact cagaagtga acgccgtagc gccgatggta gtgtgggggc 3960
tccccatgcg agagtaggga actgccaggc atcaaataaa acgaaaggct cagtcgaaag 4020
actgggcctt tcgtttttatc tgttggttgc cggtgaacgc tctcctgagt aggacaaatc 4080
cgccgggagc ggatttgaac gttgcgaagc aacggcccgg aggggtggcg gcaggacgcc 4140
cgccataaac tgccaggcat caaatataagc agaaggccat cctgacggat ggcctttttg 4200
cgtttctaca aactcttttt gtttattttt ctaaatacat tcaaataatgt atccgctggg 4260
ggatcagctt gatggccgcc agtgtgatgg atgggaagtt cttattattt aggttagtca 4320
ggtatttcca tttcaaaaaa aaaaaagta aaaaagaaaa attgggttgc gctatatata 4380
tgaaagagta tacaataatg atgtatttgg caaatcaaat accatggtct aataatcaaa 4440
cattctgatt agttgataat tcaaattgtg agcgtctaca atttgaaaga ttctgtgaa 4500
aagtttcatt aacacggaat tcgtgtcgag tagacctgtg tgttgatgaga attcttaatt 4560
catgagttgt agggagggat ttatgtcacc acaaacagag actaaagcaa gtgttggtt 4620
caaagctggg gttaaagagt acaaattgac ttattatact cctgagtacc aaaccaagga 4680
tactgatata ttggcagcat tccgagtaac tcctcaacct ggagttccac ctgaagaagc 4740
aggggccgcg gtagctgccg aatcttctac tgggtacatg acaactgtat ggaccgatgg 4800
acttaccagc cttgatcggt acaaaggcg atgctaccgc atcgagcgtg ttgttgaga 4860
aaaagatcaa tatattgctt atgtagctta cccttttagac ctttttgaag aaggttctgt 4920
taccaacatg tttacttcca ttgtaggtaa cgtatttggg ttcaaagccc tgcgcgctct 4980
acgtctggaa gatctgcgaa tccctcctgc ttatgttaaa actttccaag gtccgcctca 5040
tgggatccaa gttgaaagag ataaattgaa caagtatggg cgtcccctgt tgggatgtac 5100
tattaaacct aaattggggg tatctgctaa aaactacggg agagccgttt atgaatgtct 5160
tcgcggtgga cttgatttta ctaaagatga tgagaacgtg aactcacaac catttatgcg 5220
ttggagagat cgtttcttat tttgtgccga agcactttat aaagcacagg ctgaaacagg 5280
tgaaatcaaa gggcattact tgaatgctac tgcaggtaca tgcgaagaaa tgatcaaaag 5340
agctgtattt gctagagaat tgggcgttcc gatcgtaatg catgactact taacgggggg 5400
attcacgcga aatacagct tggctcatta ttgccgagat aatgggtctac ttcttcacat 5460
ccaccgtgca atgcatgcgg ttattgatag acagaagaat catggtatcc acttccgggt 5520
attagcaaaa gcgttacgta tgtctgggtg agatcatatt cactctggta ccgtagtagg 5580
taaacttgaa ggtgaaagag acataacttt gggctttgtt gatttactgc gtgatgattt 5640
tggtgaacaa gatcgaagtc gcggtattta tttcactcaa gattgggtct ctttaccagg 5700
tggtctaccc gtggcttcag gaggtattca cgtttggcat atgcctgctc tgaccgagat 5760
ctttggggat gattccgtac tacagttcgg tggaggaact ttaggacatc cttggatctg 5820
cagctagttc taga 5834

```

<210> 16

<211> 96

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Promotor
quimérico PpsbA* con sitios de restricción (EcoRI
y NdeI) y sitio de unión a ribosomas introducidos.

<400> 16

```

gaattcacct tgggtgacac gagtatataa gtcattgttat actggttgaat aaaaagcctt 60
ccattttgat taaataaagg aggtattttca tatgat 96

```

<210> 17

<211> 106

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmento de ADN sintético conteniendo un minicistrón, un sitio de unión a ribosomas y sitios de restricción adicionados al plásmido pBSFpsbA.

<400> 17

```
catatgtatc gattacgtaa ggaggaataa accatggacg agctctagac tgcagcatgc 60
ccgggacccct aggccgtgata tcaagcttct cgagctgtcg acagct 106
```

<210> 18

<211> 365

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica del vector pVIEP mostrando el casete para expresión de genes y los sitios de restricción adyacentes.

<400> 18

```
ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt atcgataagc ttgatatcga attcaccttg 60
gttgacacga gtatataagt catgtttatac tgttgaataa aaagccttcc attttgatta 120
aataaaggag gattttcata tgtatcgatt acgtaaggag gaataaacca tggacgagct 180
ctagactgca gcatgcccg gacccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg 240
ctgctgccac cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggcctctaaa cgggtcttga 300
gggggtttttt gctgaaagga ggaactatat ccggatcctg atatcaagct tctcgagctg 360
tcgac 365
```

<210> 19

<211> 7510

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-f-GUS entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 19

```
gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgttaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcggtgac aacgatccga gggtgttaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaatacctc tggaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcggtca aatcgctccgc aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagatacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacgagctc ctggcggttc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatctcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtcggtt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccgatgagag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
tttctctcac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttctg tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccaa gaacgttgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccc tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
```

tgttgtagct	cacaagttac	attaattttgc	ttaccgtcag	tgtctcgcact	cttgactacc	1080
aaagcattat	aaatataagg	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaaacccc	gggacgagaa	1200
gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
ttttgatttt	tttcttggtg	aataatgcc	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaaggggga	ccagcacttg	1380
atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcgga	1440
gttcaatcaa	tctttttttc	atatacattt	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
tcaacagaga	attttcgtag	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	agggggtcta	1620
ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttggggttgc	gctatatcta	ttaaagagta	1680
tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaa	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acagggtgta	1800
cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgtcgacggc	ctttttggcc	aagcttgata	tcggtaagga	ggaataaacc	1920
atggtacgtc	ctgtaga	cccaaccggt	gaaatcaaaa	aactcgacgg	cctgtgggca	1980
ttcagctctg	atcgcgaaaa	ctgtggaatt	gatcagcggt	ggtgggaaag	cgcggtacaa	2040
gaaagccggg	caattgctgt	gccaggcagt	tttaacgatc	agttcgccga	tgcagatatt	2100
cgtaattatg	cgggcaacgt	ctgggatcag	cgcgaaagtct	ttataccgaa	aggttgggca	2160
ggccagcgta	tcgtgctgcg	tttcgatgcg	gtcactcatt	acggcaaagt	gtgggtcaat	2220
aatcaggaag	tgatggagca	tcagggcggc	tatacgccat	ttgaagccga	tgtcacgccc	2280
tatgttattg	ccgggaaaaag	tgtacgtatc	accgtttgtg	tgaacaacga	actgaactgg	2340
cagactatcc	gcgcgggaat	ggtgattacc	gacgaaaaacg	gcaagaaaaa	gcagtcttac	2400
ttccatgatt	tctttaacta	tgccggagcg	catcgacg	taatgtctcta	caccaccccg	2460
aacacctggg	tggacgat	caccgtgggtg	acgcagtgtcg	cgcaagactg	taaccacg	2520
tctgttgact	ggcaggtggt	ggccaatggt	gatgtcagcg	ttgaactg	tgatgcggt	2580
caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcact	agcgggactt	tgcaagtgg	gaatccgcac	2640
ctctggcaac	cggtggaagg	ttatctctat	gaactgtg	tcacagccaa	aagccagaca	2700
gagtgtgata	tctaccgct	tcgcgtcg	atccggtcag	tggcagtga	gggccaacag	2760
ttcctgatta	accacaaacc	gttctacttt	actggctttg	gtcgtcatga	agatgcg	2820
ttgcgtggca	aaggattcga	taacgtgctg	atggtgcacg	accacgcatt	aatggactgg	2880
attggggcca	actcctaccg	tacctcgat	tacccttacg	ctgaagagat	gctcgactgg	2940
gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	ctgtcggctt	taacctctct	3000
ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	tgtacagcga	agaggcagtc	3060
aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaag	agctgatagc	gcgtgacaaa	3120
aaccacccaa	gcgtggtgat	gtggagtatt	gccaacgaac	cggatacccg	tccgcaaggt	3180
gcacgggaat	atttcgcgcc	actggcgga	gcaacgcgta	aactcgaccc	gacgcgtccg	3240
atcacctg	tcaatgta	gttctgcgac	gctcacaccg	ataccatcag	cgatctcttt	3300
gatgtgctgt	gcctgaaccg	ttattacgga	tggtatgtcc	aaagcggcga	tttgaaacg	3360
gcagagaagg	tactggaaaa	agaacttctg	gcctggcagg	agaaactgca	tcagccgatt	3420
atcatcaccg	aatacggcgt	ggatacggtta	gccgggctgc	actcaatgta	caccgacatg	3480
tggagtgaag	agtatcagtg	tgcattggtc	gatattgatc	accgcgtctt	tgatcgcgtc	3540
agcgcgctcg	tcggtgaaca	ggatgggaat	ttcgccgatt	ttgcgacctc	gcaaggcata	3600
ttgcgcgttg	gcggtaaaca	gaaagggtatc	ttcactcg	accgcaaacc	gaagtgcggc	3660
gcttttctgc	tgcaaaaacg	ctggactggc	atgaacttcg	gtgaaaaacc	gcagcaggga	3720
ggcaacaat	gaattcgagc	tcggtacccc	gcgtatagg	ccaattcga	gctcggtacc	3780
agcaccacca	gcggtgaggt	gcggaacttc	tacaacctca	aagcccataa	cgttgcggt	3840
agaacccttc	tcaggggtcaa	tcagagcagc	gtagtttgct	gcgttcggca	tcagtgtctg	3900
cagaatcgca	gagtagctat	ctgggtcaca	gtagaacaca	cggtcagcag	ccggaacata	3960
gttcttggtc	agagccgcac	gagccttagt	cagagccgca	ataatctcct	taccagcgc	4020
aacttggtcg	gtcaagtgcg	gccttggtct	gagtggtctc	aattacggta	gcagtacctta	4080
agccctcggg	ggatctgggg	aggaatgaga	tatgaaaaag	cctgaactca	ccgcgacgtc	4140
tgtcgagaag	tttctgatcg	aaaagttcga	cagcgtctcc	gacctgatgc	agctctcgga	4200
gggccaagaa	tctcgtgctt	tcagcttcga	tgtaggagg	cgtggatatg	tcctgcgggt	4260
aaatagctgc	gccgatgggt	tctacaaaaga	tcgttatgtt	tatcggcact	ttgcatcggc	4320
cgcgctccc	attccggaag	tgcttgacat	tggggagttt	agcgagagcc	tgacctattg	4380
catctcccgc	cgtgcacagg	gtgtcacgtt	gcaagacctg	cctgaaaccg	aactgcccgc	4440
tgttctacaa	ccggtcgcg	aggctatgga	tgcgatcgct	gcggccgac	ttagccagac	4500
gagcgggttc	ggcccatctg	gaccgcaagg	aatcgggtcaa	tacactacat	ggcggtgattt	4560
catatgcg	attgctgatc	cccatgtgta	tcactggcaa	actgtgatgg	acgacaccgt	4620
cagtgcgtcc	gtcgcgcagg	ctctcgatga	gctgatgctt	tgggcccagg	actgccccga	4680

```

agtccggcac ctcgtgcacg cggatttcgg ctccaacaat gtcctgacgg acaatggccg 4740
cataacagcg gtcattgact ggagcgaggc gatgttcggg gattcccaat acgaggtcgc 4800
caacatcttc ttctggaggc cgtggttggc ttgtatggag cagcagacgc gctacttcga 4860
gcggaggcat ccggagcttg caggatcgcc acgactccgg gcgtatatgc tccgcattgg 4920
tcttgacca ctctatcaga gcttggttga cggcaatttc gatgatgcag cttggggcgca 4980
gggtcgatgc gacgcaatcg tccgatccgg agccgggact gtcggggcgta cacaatcgc 5040
ccgcagaagc gcggccgtct ggaccgatgg ctgtgtagaa gtactcgccg atagtggaaa 5100
ccgacgcccc agcactcgtc cgagggcaaa gaaatagagt aggtaccagc accaccagcg 5160
gtgaggtgcg gaacttctac aacctcaaag ccataacgt tgcggataga acccttctca 5220
gggtcaatca gagcagcgta gtttgctgcg ttcggcatca gtgctgccag aatcgcgagag 5280
tagctatctg ggtcacagta gaacacacgg tcagcagccg gaacatagtt cttggtcaga 5340
gccgcacgag ccttagtcag agccgcaata atctccttac ccagcgcaac ttggtcggta 5400
agtgcggcct tgttctgagt ggtctcaatt acggtagcag tacctaagcc ctcgggggat 5460
cagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa 5520
cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct 5580
gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc 5640
catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg 5700
ggcctttcgt tttatctggt gtttgctcgg gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc 5760
gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcggggcag gacgcccgcc 5820
ataaactgcc aggcattcaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc tttttgcgtt 5880
tctacaaact ctttttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctgggggat 5940
cagcttgatg gccgccagtg tgatggatgg gaagtctcta ttatttaggt tagtcaggta 6000
tttccatttc aaaaaaaaaa aaagtaaaaa agaaaaattg ggttgcgcta tatatatgaa 6060
agagtataca ataattgatg atttggcaaa tcaaatacca tgggtctaata atcaaacatt 6120
ctgattagtt gataattcaa attgtgagcg ctcaaatatt gaaagattcc tgtgaaaagt 6180
ttcattaaca cggaattcgt gtcgagtaga ccttggttgt gtgagaattc ttaattcatg 6240
agttgtaggg agggatttat gtcaccacaa acagagacta aagcaagtgt tggattcaaa 6300
gctggtgtta aagagtacaa attgacttat tatactcctg agtaccaaac caaggatact 6360
gatataattg cagcattccg agtaactcct caacctggag ttccacctga agaagcaggg 6420
gccgcggtag ctgccgaatc ttctactggt acatggacaa ctgtatggac cgatggactt 6480
accagccttg atcggttaca agggcgatgc taccgcacg agcgtgttgt tggagaaaaa 6540
gatcaatata ttgcttatgt agcttaccct ttagaccttt ttgaagaagg ttctgttacc 6600
aacatgttta cttccattgt aggtaacgta tttgggttca aagccctgcg cgctctacgt 6660
ctggaagatc tgcgaatccc tcctgcttat gttaaaactt tccaaggtcc gcctcatggg 6720
atccaagttg aaagagataa attgaacaag tatggtcgtc ccctgttggg atgtactatt 6780
aaacctaaat tggggttatc tgctaaaaac tacggtagag ccgtttatga atgtcttcgc 6840
ggtggacttg attttactaa agatgatgag aacgtgaact cacaaccatt tatgcgttgg 6900
agagatcggt tcttattttg tgccgaagca ctttataaag cacaggctga aacaggtgaa 6960
atcaaaggcg attacttgaa cgctactgca ggtacatgcy aagaaatgat caaaagagct 7020
gtatttgcta gagaattggg ggttccgacg gtaatgcatg actacttaac ggggggattc 7080
accgcaataa ctagcttggc tcattattgc cgagataatg gtctacttct tcacatccac 7140
cgtgcaatgc atgcggttat tgatagacag aagaatcatg gtatccactt ccgggtatta 7200
gcaaaagcgt tacgtatgtc tgggtggagat catattcact ctggtaccgt agtaggtaaa 7260
cttgaagggtg aaagagacat aactttgggc tttgttgatt tactgctgta tgattttgtt 7320
gaacaagatc gaagtcgcgg tatttatttc actcaagatt gggctctctt accaggtgtt 7380
ctaccggtgg cttcaggagg tattcacgtt tggcatatgc ctgctctgac cgagatcttt 7440
ggggatgatt ccgtactaca gttcgggtgga ggaactttag gacatccttg gatctgcagc 7500
tagttctaga 7510

```

<210> 20

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
 aadA con secuencia tipo Shine-Dalgarno
 incorporada.

<400> 20
aaggagaata ccatggggga agcgggtgatc gcc

33

<210> 21
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
Oligonucleótido empleado para amplificar el gen
aadA.

<400> 21
gaacgagctc ttagacatta tttgccgac

29

<210> 22
<211> 6659
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia
nucleotídica de un fragmento de ADN del vector
pVTPA-aadA entre los bordes atpB de arroz y rbcL
de tabaco.

<400> 22
gtcagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cggtgttaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga gggtgttaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaactctc tggaaagtag ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcgggtca aatcgctccgc aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagatacct ccgatccctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacagctc ctggcgggtt attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt catttaattac tccagattcc ttcatctcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtccgtt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
tttcctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttctg tatctaactc gataaaggcg ggcgcggtatc tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccaa gaacgttgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
tggtgtacct cacaagttac attaatgtgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
ttttgatattt tttctgtgtg aataatgcc aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
atttcgttgcc ccaaacgaat cccattcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcgaaa 1440
gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgccttttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa agggggtcta 1620
ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttgggggttg gctatatcta ttaaagagta 1680
tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccatggttta ataatcgaag catgttaact 1740
tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttgaagcatg 1860

ccccccattt	tgctcgacggc	ctttttggcc	aagcttgata	tcgaattccc	ccgggctgct	1920
ccccgcgct	cgttcaatga	gaatggataa	gaggctcgtg	ggattgacgt	gagggggcag	1980
ggatggctat	atttctggga	gcgaactccg	ggcgaatacg	aagcgcttgg	atacagttgt	2040
agggagggat	ttcatcgttt	aaactcgaaa	ggagaatacc	atgggggaag	cggtgatcgc	2100
cgaagtatcg	actcaactat	cagaggtagt	tggcgatcat	gagcgccatc	tcgaaccgac	2160
gttgctggcc	gtacatttgt	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	cacacagtga	2220
tattgatttg	ctggttacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	gagctttgat	2280
caacgacctt	ttggaaactt	cggttcccc	tggagagagc	gagattctcc	gcgctgtaga	2340
agtcaccatt	gttgtgcacg	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	agcgcgaact	2400
gcaatttgga	gaatggcagc	gcaatgacat	tcttgacaggt	atcttcgagc	cagccacgat	2460
cgacattgat	ctggctatct	tgctgacaaa	agcaagagaa	catagcggtg	ccttggtagg	2520
tccagcggcg	gaggaactct	ttgatccggt	tcttgaacag	gatctatttg	aggcgctaaa	2580
tgaaacctta	acgctatgga	actcgccgcc	cgactgggct	ggcgatgagc	gaaatgtagt	2640
gcttacggtt	tcccgcattt	ggtacagcgc	agtaaccggc	aaaatcgcg	cgaaggatgt	2700
cgctgccgac	tgggcaatgg	agcgcttggc	ggcccagtat	cagcccgtca	tacttgaagc	2760
tagacaggct	tatcttggac	aagaagaaga	tcgcttggcc	tcgcgcgag	atcagttgga	2820
agaatttgtc	cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggta	gtcggcaaat	aatgtctaag	2880
agctcgttct	cgagtgaacg	cgtatagggc	ccaattcgag	ctcggtacca	gcaccaccag	2940
cggtgagggtg	cggaacttct	acaacctcaa	agcccataac	gttgcgagata	gaaccttct	3000
cagggccaat	cagagcagcg	tagtttgctg	cgcttcggcat	cagtgcgtgc	agaatcgag	3060
agtagctatc	tgggtcacag	tagaacacac	ggtcagcagc	cggaacatag	ttcttgggtca	3120
agccgcgacg	agccttagtc	agagccgcaa	taatctcctt	accagcgca	acttgggtcg	3180
tcaagtgcgg	ccttgttctg	attggtctca	attacggtag	cagtacctaa	gccctcgggg	3240
gatctggggg	ggaatgagat	atgaaaaagc	ctgaacctac	cgcgacgtct	gtcgagagat	3300
ttctgatcga	aaagttcgac	agcgtctccg	acctgatgca	gctctcgag	ggcgaagaat	3360
ctcgtgcttt	cagcttcgat	gtaggagggc	gtggatatgt	cctgcgggta	aatagctcgc	3420
ccgatggttt	ctacaaagat	cgttatgttt	atcggcactt	tgcacgggcc	gcgctcccga	3480
ttccggaagt	gcttgacatt	ggggagttta	gcgagagcct	gacctattgc	atctcccgcc	3540
gtgcacaggg	tgtaacgttg	caagacctgc	ctgaaaccga	actgcccgt	gttctacaac	3600
cggctcgcgga	ggctatggat	gcgatcgctg	cgcccgatct	tagccagacg	agcgggttcg	3660
gccctattcg	accgcaagga	atcggtcaat	acactacatg	gcgtgatttc	atatgcgcga	3720
ttgctgatcc	ccatgtgtat	cactggcaaa	ctgtgatgga	cgacaccgtc	agtgcgtccg	3780
tcgcgccaggc	tctcgatgag	ctgatgcttt	gggcccagga	ctgccccgaa	gtccggcacc	3840
tcgtgcacgc	ggatttcggc	tccaacaatg	tcctgacgga	caatggccgc	ataacagcgg	3900
tcattgactg	gagcgaggcg	atgttcgggg	attcccaata	cgaggtcgcc	aacatcttct	3960
tctggaggcc	gtggttggct	tgtatggagc	agcagacgcg	ctacttcgag	cggaggcatc	4020
cggagcttgc	aggatcgcca	cgactccggg	cgtatatgct	ccgcattggt	cctgaccaac	4080
tctatcagag	ccttggttgac	ggcaatttct	atgatgcagc	ttggggcgag	ggtcgatgcg	4140
acgcaatcgt	ccgatccgga	gccgggactg	tcggggcgta	acaaatcgcc	cgcagaagcg	4200
cggccgtctg	gaccgtctg	tgtgtagaag	tactcgccga	tagtggaaac	cgacgccccg	4260
gcactcgtcc	gagggcaaa	aaatagagta	ggtaccagca	ccaccagcgg	tgagggtcgg	4320
aacttctaca	acctcaaagc	ccataacgtt	gcggatagaa	cccttctcag	ggtcaatcag	4380
agcagcgtag	tttgctgcgt	tcggcatcag	tgctgccaga	atcgagagat	agctatctgg	4440
gtcacagtag	aacacacggt	cagcagccgg	aacatagttc	ttggtcagag	ccgcacgagc	4500
cttagtcaga	gccgcaataa	tctccttacc	cagcgcaact	tggtcggtaa	gtgcggcctt	4560
gttctgagtg	gtctcaatta	cggtagcagt	acctaaagccc	tcgggggatc	agcttggtcg	4620
ttttggcgga	tgagagaaga	ttttcagcct	gatacagatt	aaatcagaac	gcagaagcgg	4680
tctgataaaa	cagaatttgc	ctggcggcag	tagcgcggtg	gtcccacctg	accccatgcc	4740
gaactcagaa	gtgaaacgcc	gtagcgccga	tggtagtgtg	gggtctcccc	atgcgagagt	4800
agggaaactgc	caggcatcaa	ataaaaacgaa	aggctcagtc	gaaagactgg	gcctttcggt	4860
ttatctgttg	tttgtcggtg	aacgctctcc	tgagtaggac	aaatccgccc	ggagcggatt	4920
tgaacgttgc	gaagcaacgg	cccggagggt	ggcgggcagg	acgcccggca	taaactgcc	4980
ggcatcaaat	taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	ttttgcgttt	ctacaaactc	5040
tttttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctgggggatc	agcttgatgg	5100
ccgccagtgt	gatggatggg	aagttcctat	tatttaggtt	agtcagggtat	ttccatttca	5160
aaaaaaaaaa	aagtaaaaaa	gaaaaatttg	gttgcgctat	atatatgaaa	gagtatacaa	5220
taatgatgta	tttggcaaat	caaataccat	ggtctaataa	tcaaacattc	tgattagttg	5280
ataattcaaa	ttgtgagcgc	tcacaatttg	aaagattcct	gtgaaaagtt	tcattaacac	5340
ggaattcgtg	tcgagtagac	cttggtgttg	tgagaattct	taattcatga	gttgtaggga	5400
gggattttatg	tcaccacaaa	cagagactaa	agcaagtgtt	ggattcaaa	ctggtgttaa	5460
agagtacaaa	ttgacttatt	atactcctga	gtaccaaac	aaggatactg	atatattggc	5520


```

agcattccga gtaactcctc aacctggagt tccacctgaa gaagcagggg ccgcggttagc 5580
tgccgaatct tctactggta catggacaac tgtatggacc gatggactta ccagccttga 5640
tcgttacaaa gggcgatgct accgcacatga gcgtgttggt ggagaaaaag atcaatatat 5700
tgcttatgta gcttaccctt tagacctttt tgaagaaggt tctgttacca acatgtttac 5760
ttccattgta ggtaacgtat ttgggttcaa agccctgcgc gctctacgtc tggaagatct 5820
gcgaatccct cctgcttatg ttaaaacttt ccaaggcccg cctcatggga tccaagttga 5880
aagagataaa ttgaacaagt atggctcgtcc cctgttggga tgtactatta aacctaaatt 5940
ggggttatct gctaaaaact acggtagagc cgtttatgaa tgtcttcgcg gtggacttga 6000
ttttactaaa gatgatgaga acgtgaactc acaaccattt atgcgttgga gagatcgttt 6060
cttattttgt gccgaagcac tttataaagc acaggctgaa acaggtgaaa tcaaagggca 6120
ttacttgaat gctactgcag gtacatgcga agaaatgatc aaaagagctg tatttgctag 6180
agaattgggc gttccgatcg taatgcatga ctacttaacg gggggattca ccgcaaatac 6240
tagcttggtc cattattgct gagataatgg tctactttct cacatccacc gtgcaatgca 6300
tgcggttatt gatagacaga agaatactgg tatccacttc cgggtattag caaaagcggt 6360
acgtatgtct ggtggagatc atattcactc tggtagcgta gtaggtaaac ttgaaggtga 6420
aagagacata actttgggct ttgttgattt actgcgtgat gattttgttg aacaagatcg 6480
aagtcgcggt atttatttca ctcaagattg ggtctcttta ccagggtgtc taccctggc 6540
ttcaggaggt attcacgttt ggcatatgcc tgctctgacc gagatctttg gggatgattc 6600
cgtactacag ttcggtggag gaacttttag acatccttgg atctgcagct agttctaga 6659

```

<210> 23

<211> 8327

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-f-GUS-aadA entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 23

```

gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga ggttgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaatactc tggaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggctcgtca aatcgctccg aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccattctgt tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagatacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacgagctc ctggcgggtc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatctcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtccggt cccctactcc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaaa tagtccgatt 720
tttctctcac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttctg tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccaa gaacgttgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
tggtgtacct cacaagttac attaatgtgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggacgagaa 1200
gtagtaggat tggttctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
ttttgatttt tttcttggtg aataatgcca aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
atttcgttgc ccaaacgaat cccattcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcgaaa 1440
gttcaatcaa tctttttttc atatacattt tgctttttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa aggggtgcta 1620
ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttgggggtgc gctatatcta ttaaagagta 1680

```


tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaa	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acaggggtgta	1800
cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgtcgacggc	cttttttgcc	aagcttgata	tcggtaagga	ggaataaacc	1920
atggtagctc	ctgtagaaac	cccaacccgt	gaaatcaaaa	aactcgacgg	cctgtgggca	1980
ttcagtcctg	atcgcgaaaa	ctgtggaatt	gatcagcggt	ggtgggaaag	cgcgttacaa	2040
gaaagccggg	caattgctgt	gccaggcagt	tttaacgata	agttcgccga	tgcagatatt	2100
cgtaattatg	cgggcaacgt	ctggtatcag	cgcgaaagtct	ttataaccgaa	aggttgggca	2160
ggccagcgta	tcgtgctgcg	tttcgatgcg	gtcactcatt	acggcaaagt	gtgggtcaat	2220
aatcaggaag	tgatggagca	tcagggcggc	tatacgccat	ttgaagccga	tgtcacgcgc	2280
tatgttattg	cggggaaaag	tgtacgtatc	accgtttgtg	tgaacaacga	actgaactgg	2340
cagactatcc	cgcgggaat	ggtgattacc	gacgaaaacg	gcaagaaaaa	gcagtcctac	2400
ttccatgatt	tctttaacta	tgccggaatc	catcgacgcg	taatgctcta	caccacgcgc	2460
aacacctggg	tggacgatat	caccgtggtg	acgcatgtcg	cgcaagactg	taaccacgcg	2520
tctgttgact	ggcaggtggt	ggccaatggt	gatgtcagcg	ttgaactgcg	tgatgcggtat	2580
caacaggtgg	ttgcaactgg	acaaggcaact	agcgggactt	tgcaagtgggt	gaatccgcac	2640
ctctggcaac	cgggtgaagg	ttatctctat	gaactgtgcg	tcacagccaa	aagccagaca	2700
gagtgtgata	tctacccgct	tcgcgtcggc	atccggtcag	tggcagtga	gggcgaacag	2760
ttcctgatta	accacaaacc	gttctacttt	actggctttg	gtcgtcatga	agatgcggac	2820
ttgctgggca	aaggattcga	taacgtgctg	atggtgcacg	accacgcatt	aatggactgg	2880
attggggcca	actcctaccg	tacctcgcat	tacccttacg	ctgaagagat	gctcgactgg	2940
gcagatgaac	atggcatcgt	ggtgattgat	gaaactgctg	ctgtcggctt	taacctctct	3000
ttaggcattg	gtttcgaagc	gggcaacaag	ccgaaagaac	tgtacagcga	agaggcagtc	3060
aacggggaaa	ctcagcaagc	gcacttacag	gcgattaaag	agctgatagc	gcgtgacaaa	3120
aaccacccaa	gcgtgggtgat	gtggagtatt	gccaacgaac	cggatacccg	tccgcgaagt	3180
gcacgggaat	atttcgcgcc	actggcgga	gcaacgcgta	aactcgacce	gacgcgtccg	3240
atcacctgcg	tcaatgtaat	gttctgcgac	gctcacaccg	ataccatcag	cgatctcttt	3300
gatgtgctgt	gcctgaaccg	ttattacgga	tggtatgtcc	aaagcggcga	tttgaaacg	3360
gcagagaagg	tactggaaaa	agaacttctg	gcctggcagg	agaaactgca	tcagccgatt	3420
atcatcaccc	aatacggcgt	ggatacgtta	gccgggctgc	actcaatgta	caccgacatg	3480
tggagtgaag	agtatcagtg	tgcattggctg	gatattgtatc	accgcgtctt	tgatcgcgtc	3540
agcgcgctcg	tcggtgaaca	ggatgggaat	ttcgcgcat	ttgcgacctc	gcaaggcata	3600
ttgcgcgttg	gcggtaacaa	gaaagggatc	ttcactcgcg	accgcaaacc	gaagtccgcg	3660
gcttttctgc	tgcaaaaacg	ctggactggc	atgaacttcg	gtgaaaaacc	gcagcaggga	3720
ggcaacaat	gaattcgagc	tcggtacccc	gcgtatagaa	ggagaatacc	atgggggaag	3780
cggtgatcgc	cgaagtatcg	actcaactat	cagaggtagt	tggcgtcatc	gagcgccatc	3840
tcgaaccgac	gttgctggcc	gtacatttgt	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	3900
cacacagtga	tattgatttg	ctggttacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	3960
gagctttgat	caacgcacct	ttggaaactt	cggcttcccc	tggagagagc	gagattctcc	4020
gcgctgtaga	agtcaccatt	ggtgtgcacg	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	4080
agcgcgaact	gcaatttgga	gaatggcagc	gcaatgacat	tcttgacagt	atcttcagag	4140
cagccacgat	cgacattgat	ctggctatct	tgtgtgacaaa	agcaagagaa	catagcggtg	4200
ccttggtagg	tccagcggcg	gaggaactct	ttgatccggt	tcctgaacag	gatctatttg	4260
aggcgctaaa	tgaaacctta	acgctatgga	actcgccgcc	cgactgggct	ggcgatgagc	4320
gaaatgtagt	gcttacgttg	tcccgcattt	ggtacagcgc	agtaaccggc	aaaatcgcg	4380
cgaaggatgt	cgctgcgcgac	tgggcaatgg	agcgcctgcc	ggcccagtat	cagcccgtca	4440
tacttgaagc	tagacaggct	tatcttggac	aagaagaaga	tcgcttggcc	tcgcgcgcag	4500
atcagttgga	agaatttgtc	cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggta	gtcggcaaat	4560
aatgtctaag	agctcgttcc	aattcgagct	cggtagcagc	accaccagcg	gtgaggtgcg	4620
gaacttctac	aacctcaaa	cccataacgt	tgccgtaga	acccttctca	gggtcaatca	4680
gagcagcgta	gtttgctgcg	ttcgcatca	gtgctgccag	aatcgacag	tagctatctg	4740
ggtcacagta	gaacacacgg	tcagcagccg	gaacatagtt	cttggtcaga	gccgcacgag	4800
ccttagtcag	agccgcaata	atctccttac	ccagcgcaac	ttggtcggtc	aagtgcggcc	4860
ttgttctgag	tggtctcaat	tacggtagca	gtacctaaag	cctcggggga	tctggggagg	4920
aatgagatat	gaaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	4980
agttcgacag	cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	5040
gcttcgatgt	aggaggcggt	ggatatgtcc	tgccgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	5100
acaaagatcg	ttatgtttat	cggcactttg	catcgccgcg	gctcccagtt	ccggaagtgc	5160
ttgacattgg	ggagtttagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgcggt	gcacagggtg	5220
tcacgttgca	agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgcgtgt	tctacaaccg	gtcgcggagg	5280
ctatggatgc	gatcgctgcg	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	5340

```

cgcaaggaat cgggtcaatac actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc 5400
atgtgtatca ctggcgaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc 5460
tcgatgagct gatgcttttg gccgaggact gcccgaagt cccggcacctc gtgcacgcgg 5520
atctcggtc caacaatgtc ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga 5580
gcgaggcgat gttcggggat tcccaatacg aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt 5640
ggttggcttg tatggagcag cagacgcgct acttcgagcg gaggcatccg gagcttgagc 5700
gatcgccacg actccgggag tatatgctcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct 5760
tggttgacgg caatttcgat gatgcagctt gggcgaggg tcatgacgac gcaatcgtcc 5820
gatccggagc cgggactgtc gggcgtagac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga 5880
ccgatggctg tgtagaagta ctgcgcgata gtggaaaccg acgcccagc actcgtccga 5940
gggcaaagaa atagagtagg taccagcacc accagcgggtg aggtgcggaa cttctacaac 6000
ctcaaagccc ataacgttgc ggatagaacc cttctcaggg tcaatcagag cagcgtagtt 6060
tgctgcgttc ggcacagtg ctgccagaat cgcagagtag ctatctgggt cacagtagaa 6120
cacacggtca gcagccggaa catagtctct ggtcagagcc gcacgagcct tagtcagagc 6180
cgcaataatc tccttaccga gcgcaacttg gtcggtaagt gcggccttgt tctgagtggg 6240
ctcaattacg gtagcagtag ctaagccctc gggggatcag cttggctgtt ttggcggatg 6300
agagaagatt ttcagcctga tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca 6360
gaatttgcct ggcggcagta gcgcggtggg cccacctgac cccatgccga actcagaagt 6420
gaaacgcgct agcgcgagtg gtagtgtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgcca 6480
ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt 6540
tgctcgtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgcggg agcggatttg aacgttgcca 6600
agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgcata aactgccag catcaaatta 6660
agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactctt tttgtttatt 6720
tttctaaata cattcaaata tgtatccgct gggggatcag cttgatggcc gccagtgtga 6780
tggtatggaa gttcttatta tttaggttag tcaggatatt ccatttcaaa aaaaaaaaaa 6840
gtaaaaaaga aaaattgggt tgcgctatat atatgaaaga gtatacaata atgatgtatt 6900
tggaacatca aataccatgg tctaataatc aaacattctg attagttagt aattcaaatt 6960
gtgagcgctc acaatttgaa agattcctgt gaaaagtttc attaacacgg aattcgtgtc 7020
gagtagacct tgttgttgtg agaattctta attcatgagt tgtaggagg gatttatgtc 7080
accacaaaca gagactaaag caagtgttg attcaaagct ggtgttaaag agtacaatt 7140
gacttattat actcctgagt accaaacca ggactagat atattggcag cattccgagt 7200
aactcctcaa cctggagttc cacctgaaga agcaggggcc gcggtagctg ccgaatcttc 7260
tactggtaca tggacaactg tatggaccga tggacttacc agccttgatc gttacaaagg 7320
gcgatgctac cgcacgagc gtgttgttg agaaaaagat caatatattg cttatgtagc 7380
ttacccttta gacctttttg aagaaggttc tgttaccaac atgtttactt ccattgtagg 7440
taacgtatth gggttcaaag ccctgcgcgc tctacgtctg gaagatctgc gaatccctcc 7500
tgcttatgtt aaaactttcc aagggtccgc tcatgggatc caagttgaaa gagataaatt 7560
gaacaagtat ggtcgtcccc tgttgggatg tactattaaa cctaaattgg ggttatctgc 7620
taaaaactac ggtagagccg tttatgaatg tcttcgcggt ggacttgatt ttactaaaga 7680
tgatgagaac gtgaactcac aaccatttat gcgttggaga gatcgtttct tattttgtgc 7740
cgaagcactt tataaagcac aggtgaaac aggtgaaatc aaagggcatt acttgaatgc 7800
tactgcaggt acatgcgaag aaatgatcaa aagagctgta tttgctagag aattgggctg 7860
tccgatcgta atgcatgact acttaacggg gggattcacc gcaaatacta gcttggctca 7920
ttattgccga gataatggtc tacttcttca catccaccgt gcaatgcatg cggttattga 7980
tagacagaag aatcatggtt tccacttccg ggtattagca aaagcgttac gtatgtctgg 8040
tgagatcat attcactctg gtaccgtagt aggtaaaact gaaggtgaaa gagacataac 8100
tttgggcttt gttgatttac tgcgtgatga ttttgttgaa caagatcgaa gtcgcgggat 8160
ttatttcact caagattggg tctctttacc aggtgttcta cccgtggctt caggaggat 8220
tcacgttttg catatgcctg ctctgaccga gatctttggg gatgattccg tactacagtt 8280
cgggtgagga actttaggac atccttggtat ctgcagctag ttctaga 8327

```

<210> 24

<211> 7549

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-HB-aadA entre los bordes atpB de arroz y

rbcL de tabaco.

<400> 24

gtcgaaggta	tgtcctgaag	ttctttgtaa	cgttgtaaag	tttgcttaac	tctttgtgca	60
gtttcataat	gttcgttgcc	aacgatccga	ggttgtaaca	tagttgaggt	tgaatctaaa	120
ggatctactg	caggataaat	ccctttggaa	gctaatacctc	tggaaagtac	ggtagtagca	180
tccaaatgtg	caaagtgtgt	agcaggagca	gggtcgggtca	aatcgtccgc	aggtacataa	240
accgcttgga	togaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaagaa	300
cccattttctg	tactaagagt	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
gcagatacct	ccgatcctgc	ttgaacaaaa	cgaaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcaa	accaactctc	480
atacgagctc	ctggcggttc	attcattttg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
cgagtcctgt	cccatactcc	gccaaatacg	gatacgcccc	cgtgagcttt	agcaatattg	660
ttgattaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctccccaaa	tagtccgatt	720
tttctctcac	gcgataagg	agctaaaaga	tcgaccacct	taataccagt	ttcaaagatg	780
gataatttcg	tatctaactc	gataaaggcg	ggcgcggtac	tatgaatagg	gaatgttgca	840
ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctccccc	gaacggtgaa	aattcgtcca	900
agagtagctc	caccgacagg	aacactgaga	ggagctcccg	tgtcaatcac	ttccattcct	960
ctcatcaacc	catctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
tgttgtagct	cacaagttac	attaattttg	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
aaagcattat	aaatataaag	taacttgccc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
ataatttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaacccc	gggacgagaa	1200
gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
ttttgatttt	tttcttggtg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcggaaa	1440
gttcaatcaa	tctttttttc	atatacat	tgccttttgt	aaacgatttg	tgcctactct	1500
actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
tcaacagaga	attttctgtg	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	agggggtcta	1620
ttagaacttt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggtgc	gctatatcta	ttaaagagta	1680
tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatggttta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acaggggtga	1800
cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgtcagaggtc	gacgggtatcg	ataagcttga	tatcggttaag	gagggaataaa	1920
ccatggagaa	catcacatca	ggattcctag	gacccttgct	cgtgttacag	gcgggggtttt	1980
tcttggtgac	agaatcctc	acaataccgc	agagtctaga	ctcgtggtgg	acttctctca	2040
attttctagg	gggatctccc	gtgtgtcttg	gccaaaattc	gcagtcacca	acctccaatc	2100
actcaccaac	ctcctgtcct	ccaattttgtc	ctgggttatcg	ctggatgtgt	ctgcggcggt	2160
ttatcatatt	cctcttcate	ctgctgctat	gcctcatctt	cttatttggtt	cttctggatt	2220
atcaagggtat	gttgcccggt	tgtcctctaa	ttccaggatc	aacaacaacc	agtaggggac	2280
catgcaaaac	ctgcacgact	cctgctcaag	gcaactctat	gtttccctca	tgttgctgta	2340
caaaacctac	ggatggaaat	tgcacctgta	ttcccatccc	atcgtcctgg	gctttcgcaa	2400
aatacctatg	ggagtgggccc	tcagtccggt	tctcttggtc	cagtttacta	gtgccatttg	2460
ttcagtggtt	cgtaggggctt	tccccactg	tttggtcttc	agctatatgg	atgatgtggg	2520
attggggggc	aagtctgtac	agcatcgtga	gtccctttat	accgctgtta	ccaattttct	2580
tttgtctctg	ggtatacatt	taagaattgg	gatccggctg	ctaacaaagc	ccgaaaggaa	2640
gctgagttgg	ctgctgccac	cgctgagcaa	taactagcat	aacccttgg	ggcctctaaa	2700
cgggtcttga	gggtgttttt	gctgaaagga	ggaactatat	ccggtacctg	atatcaagct	2760
tctcgacggc	ctttttggcc	aagcttgata	tcgaattccc	ccgggctgct	cccccgcg	2820
cgttcaatga	gaatggataa	gaggctcgtg	ggattgacgt	gagggggcag	ggatggctat	2880
atttctggga	gogaactccg	ggcgaatacg	aagcgcttgg	atacagttgt	agggagggat	2940
ttcatcggtt	aaactcgaaa	ggagaataacc	atgggggaag	cgggtatcgc	cgaagtatcg	3000
actcaactat	cagaggtagt	tggcgtcatc	gagcgccatc	tcgaaccgac	gttgctggcc	3060
gtacatttgt	acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	cacacagtga	tattgatttg	3120
ctggttacgg	tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	gagctttgat	caacgacctt	3180
tttgaaactt	cggcttcccc	tggagagagc	gagattctcc	gcgctgtaga	agtcaccatt	3240
gttggtgcacg	acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	agcgcgaact	gcaatttgga	3300
gaatggcagc	gcaatgacat	tcttgacagt	atcttcgagc	cagccacgat	cgacattgga	3360
ctggctatct	tgtcgacaaa	agcaagagaa	catagcgttg	ccttggtagg	tcacgcgcg	3420
gaggaactct	ttgatccggt	tcctgaacag	gatctatttg	agggcgctaaa	tgaaacctta	3480

acgctatgga	actcgccgcc	cgactgggct	ggcgatgagc	gaaatgtagt	gcttacgttg	3540
tcccgcattt	ggtacagcgc	agtaaccggc	aaaatcgccg	cgaaggatgt	cgctgccgac	3600
tgggcaatgg	agcgccctgcc	ggcccagtat	cagcccgtca	tacttgaagc	tagacaggct	3660
tatcttggac	aagaagaaga	tcgcttggcc	tcgcgcgcag	atcagttgga	agaatttgtc	3720
cactacgtga	aaggcgagat	caccaaggtg	gtcggcaaat	aatgtctaag	agctcgttct	3780
cgagtgaacg	cgtatagggc	ccaattcgag	ctcgggtacca	gcaccaccag	cggtagggtg	3840
cggaaacttct	acaacctcaa	agcccataac	gttgccgata	gaacccttct	cagggtcaat	3900
cagagcagcg	tagtttgctg	cgttcggcat	cagtgtctgcc	agaatcgag	agtagctatc	3960
tgggtcacag	tagaacacac	ggtcagcagc	cggaaacatag	ttcttgggtca	gagccgcacg	4020
agccttagtc	agagccgcaa	taatctcctt	acccagcgca	acttgggtcgg	tcaagtgcgg	4080
ccttgttctg	agtgggtctca	attacggtag	cagtaccta	gccctcgggg	gatctgggga	4140
ggaatgagat	atgaaaaagc	ctgaactcac	cgcgacgtct	gtcgagaagt	ttctgatcga	4200
aaagttcgac	agcgtctccg	acctgatgca	gctctcggag	ggcgaagaat	ctcgtgcttt	4260
cagcttcgat	gtaggagggc	gtggatatgt	cctgcgggta	aatagctgcg	ccgatgggtt	4320
ctacaaagat	cgttatgttt	atcggcactt	tgcctcggcc	gcgctcccga	ttccggaagt	4380
gcttgacatt	ggggagttta	gcgagagcct	gacctattgc	atctcccgcc	gtgcacaggg	4440
tgtcacgttg	caagacctgc	ctgaaaccga	actgcccgtc	gttctacaac	cgggtcgcgga	4500
ggctatggat	gcgatcgctg	cggccgatct	tagccagacg	agcgggttcg	gcccattcgg	4560
accgcaagga	atcgggtcaat	acactacatg	gcgtgatctc	atatgcgcga	ttgctgatcc	4620
ccatgtgtat	cactggcaaa	ctgtgatgga	cgacaccgtc	agtgcgtccg	tcgcgcaggc	4680
tctcgatgag	ctgatgcttt	gggccgagga	ctgccccgaa	gtccggcacc	tcgtgcacgc	4740
ggatttcggc	tccaacaatg	tcttgacgga	caatggccgc	ataacagcgg	tcattgactg	4800
gagcgaggcg	atgttcgggg	attcccaata	cgaggtcgcc	aacatcttct	tctggaggcc	4860
gtggttggct	tgtatggagc	agcagacgcg	ctacttcgag	cggaggcatc	cggagcttgc	4920
aggatcgcca	cgactccggg	cgtatatgct	ccgcattggg	cttgaccaac	tctatcagag	4980
cttggttgac	ggcaatttcg	atgatgcagc	ttggggcgag	ggtcgatgcg	acgcaatcgt	5040
ccgatccgga	gccgggactg	tcgggcgtac	acaaatcgcc	cgcagaagcg	cggccgtctg	5100
gaccgatggc	tgtgtagaag	tactcgccga	tagtggaaac	cgacgcccc	gcactcgtcc	5160
gagggcaaa	aaatagagta	ggtaccagca	ccaccagcgg	tgaggtgcgg	aacttctaca	5220
acctcaaagc	ccataacggt	gcggatagaa	cccttctcag	ggtcaatcag	agcagcgtag	5280
tttctgcgtg	tcggcatcag	tgctgccaga	atcgagagt	agctatctgg	gtcacagtag	5340
aacacacggg	cagcagccgg	aacatagttc	ttggtcagag	ccgcacgagc	cttagtcaga	5400
gccgcaataa	tctccttacc	cagcgcgaact	tggctcggtaa	gtgcggcctt	gttctgagtg	5460
gtctcaatta	cggtagcagt	acctaagccc	tcggggggatc	agcttggctg	ttttggcgga	5520
tgagagaaga	ttttcagcct	gatacagatt	aaatcagaac	gcagaagcgg	tctgataaaa	5580
cagaatttgc	ctggcggcag	tagcgcggtg	gtcccacctg	accccatgcc	gaactcagaa	5640
gtgaaacgcc	gtagcgccga	tggtagtggt	gggtctcccc	atgcgagagt	agggaaactgc	5700
caggcatcaa	ataaaaacgaa	aggctcagtc	gaaagactgg	gcctttcgtt	ttatctgttg	5760
tttgtcggtg	aacgctctcc	tgagtaggac	aaatccgcgc	ggagcggatt	tgaacgttgc	5820
gaagcaacgg	cccggagggt	ggcgggcagg	acgcccgcga	taaaactgcc	ggcatcaaat	5880
taagcagaag	gccatcctga	cggatggcct	ttttcgcttt	ctacaaactc	tttttgttta	5940
tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctgggggatc	agcttgatgg	ccgccagtg	6000
gatggatggg	aagttcttat	tatttaggtt	agtcagggtat	ttccatttca	aaaaaaaaaa	6060
aagtaaaaaa	gaaaaatttg	gttgcgctat	atatatgaaa	gagtatacaa	taatgatgta	6120
tttggcaaat	caaataccat	ggtctaataa	tcaaacattc	tgattagttg	ataattcaaa	6180
ttgtgagcgc	tcacaatttg	aaagattcct	gtgaaaagtt	tcattaacac	ggaattcgtg	6240
tcgagtagac	cttggttggtg	tgagaattct	taattcatga	gttgtaggga	gggatttatg	6300
tcaccacaaa	cagagactaa	agcaagtgtt	ggattcaaag	ctggtgttaa	agagtacaaa	6360
ttgacttatt	atactcctga	gtaccaaacc	aaggatactg	atatattggc	agcattccga	6420
gtaactcctc	aacctggagt	tcacactgaa	gaagcagggg	ccgcggtagc	tgccgaatct	6480
tctactggta	catggacaac	tgtatggacc	gatggactta	ccagccttga	tcgttacaaa	6540
gggcgatgct	accgcacgca	gcgtgttgtt	ggagaaaaag	atcaatata	tgcttatgta	6600
gcttaccctt	tagacctttt	tgaagaaggt	tctgttacca	acatgtttac	ttccattgta	6660
ggtaacgtat	ttgggttcaa	agccctgcgc	gctctacgtc	tggaagatct	gcgaatccct	6720
cctgcttatg	ttaaaacttt	ccaaggtccg	cctcatggga	tccaagttga	aagagataaa	6780
ttgaacaagt	atggctcgtcc	cctgttggga	tgtactatta	aacctaaatt	ggggttatct	6840
gctaaaaact	acggtagagc	cgtttatgaa	tgctctcgcg	gtggacttga	ttttactaaa	6900
gatgatgaga	acgtgaactc	acaaccattt	atgcgttggg	gagatcgttt	cttattttgt	6960
gccgaagcac	tttataaagc	acaggctgaa	acaggtgaaa	tcaaagggca	ttacttgaat	7020
gctactgcag	gtacatgcga	agaaatgatc	aaaagagctg	tatttgctag	agaattgggc	7080
gttccgatcg	taatgcatga	ctacttaacg	gggggattca	ccgcaaatac	tagcttggct	7140

cattattgcc	gagataatgg	tctacttctt	cacatccacc	gtgcaatgca	tgcgggttatt	7200
gatagacaga	agaatcatgg	tatccacttc	cgggtattag	caaaagcggt	acgtatgtct	7260
ggtggagatc	atattcactc	tggtagccgta	gtaggttaa	ttgaaggtga	aagagacata	7320
actttgggct	ttgttgattt	actgcgtgat	gattttgttg	aacaagatcg	aagtcgcggt	7380
atattattca	ctcaagattg	ggtctcttta	ccagggtgtc	taccggtggc	ttcaggagggt	7440
attcacggtt	ggcatatgcc	tgctctgacc	gagatccttg	gggatgattc	cgtactacag	7500
ttcgggtggag	gaacttttagg	acatccttgg	atctgcagct	agttctaga		7549

<210> 25

<211> 6465

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-Bar entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 25

gtcagggtca	tgctctgaag	ttctttgtaa	cggttgtaaag	tttgcttaac	tctttgtgca	60
gtttcataat	gttcgttgcc	aacgatccga	ggttgtaaca	tagttgaggt	tgaatctaaa	120
ggatctactg	caggataaat	ccctttggaa	gctaattctc	tggaaggtac	ggtagtagca	180
tcctaatgtg	caaatgttgt	agcaggagca	gggtcgggtca	aatcgtccgc	aggtacataa	240
accgcttgga	tcgaagttat	agatcccttt	ttagtagaag	taattctttc	ttgcaaagaa	300
cccatttctg	tactaagagt	aggttgataa	cccactgcag	agggcattct	ccctaataag	360
gcagatacct	ccgatcctgc	ttgaacaaaa	cgaaagatat	tatcgatgaa	tagaagcacg	420
tcttgcttat	taacatctcg	gaaatattct	gccatagtta	gggcagtcaa	accaactctc	480
atacgagctc	ctggcggttc	attcattttg	ccatagacta	gagctacctt	tgattcctca	540
agattttttt	cattaattac	tccagattcc	ttcattttcca	tataaagatc	atttccttca	600
cgagtcgggt	cccctactcc	gccaaatacg	gatacgcccc	cgtgagcttt	agcaattttg	660
ttgattaatt	ccatgatgag	tactgtttta	cctactccag	ctcccccaaa	tagtccgatt	720
tttctctcac	gccgataagg	agctaaaaga	tcgaccacct	taataaccagt	ttcaaagatg	780
gataatttcg	tatctaactc	gataaaggcg	ggcgcggtac	tatgaatagg	gaatgttgca	840
ctagtatcta	caggacccaa	attgtcaaca	ggctcccaaa	gaacgttgaa	aattcgtcca	900
agagtagctc	caccgacagg	aacactgaga	ggagctcccg	tgtcaatcac	ttccattcct	960
ctcatcaacc	catctgtagc	actcatagct	acagctctaa	ctcgattatt	tcctaataat	1020
tgttgtagct	cacaagttac	attaattttg	ttaccgtcag	tgtctcgact	cttgactacc	1080
aaagcattat	aaatataagg	taactttgcc	gggggaaaag	tgacatccag	cacgggtcca	1140
ataattttgat	cgatacgccc	tgtacttttt	tcttcaattg	tagaaaaccc	gggacgagaa	1200
gtagtaggat	tggttctcat	aattatcaca	taattttcaa	aaaaaaggaa	tttatcgaaa	1260
ttttgatatt	tttcttggtg	aataatgcca	aatcaacacc	aaaaaaatat	ccaaaaatcc	1320
aaaagtcaaa	aggaaatgaa	ttagttaatt	caataagaga	gaaaagggga	ccagcacttg	1380
atttcgttgc	ccaaacgaat	cccattcaat	cgtttactca	tggaatgagt	ccgtcgga	1440
gttcaatcaa	tctttttttc	atatacat	tgccctttgt	aaacgatttg	tgccactctc	1500
actttcttat	ctaggacttc	gatatacaaa	atatatacta	ctgtgaagca	tagattgctg	1560
tcaacagaga	attttctgtg	tatttaggta	tttccactca	aaataagaaa	agggggtcta	1620
ttaagaactt	aataaggatt	agaagttgat	ttgggggttg	gctatatcta	ttaaagagta	1680
tacaataaag	atggatttgg	tgaatcaaat	ccatgggtta	ataatcgaag	catgttaact	1740
tacaataaca	acaactcaag	tcgaatgaat	tcctatagca	tagaatgtac	acaggggtga	1800
cccattatat	atgaatgaaa	catattatat	gaatgaaaca	tattcattaa	cttaagcatg	1860
ccccccattt	tgctcgacggc	cttttttgcc	aagcttgata	tcgaattccc	ccgggctgct	1920
cccccgccgt	cgttcaatga	gaatggataa	gaggctcgtg	ggattgacgt	gagggggcag	1980
ggatggctat	atttctggga	gcgaactccg	ggcgaatacg	aagcgcttgg	atacagttgt	2040
agggagggat	ttcatcggtt	aaactcgagg	tcgacgggtat	cgataagctt	gatatcggtg	2100
aggaggaata	aacaatgagc	ccagaacgac	gcccggccga	catccgccgt	gccaccgagg	2160
cggacatgcc	ggcgggtctgc	accatcgcta	accactacat	cgagacaagc	acgggtcaact	2220
tcctgtaccga	ccgcaggagaa	ccgcaggagta	ggacggacga	cctcgtccgt	ctgcgggagc	2280
gctatccctg	gctcgtcgcc	gaggtggacg	gcgaggtcgc	cggcatcgcc	tacgcggggc	2340
cctggaaggc	acgcaacgcc	tacgactgga	cggccgagtc	gaccgtgtac	gtctcccccc	2400

gccaccagcg	gacgggactg	ggctccacgc	tctacaccca	cctgctgaag	tccctggagg	2460
cacagggctt	caagagcggtg	gtcgctgtca	tcgggctgcc	caacgacccg	agcgtgcgca	2520
tgcacgaggg	gctcggatat	gccccccgcg	gcattgctgcg	ggcgggccggc	ttcaagcacg	2580
ggaactggca	tgacgtgggt	ttctggcagc	tggacttcag	cctgcccggta	ccgccccgtc	2640
cggtcctgcc	cgtcaccgag	atctgatgac	ccgggggatc	ctgatatcaa	gcttctcgag	2700
tgaacgcgta	tagggcccaa	ttcgagctcg	gtaccagcac	caccagcggg	gaggtgcgga	2760
acttctacaa	cctcaaagcc	cataacgttg	cggatagaac	ccttctcagg	gtcaatcaga	2820
gcagcgtagt	ttgctgcggt	cggcatcagt	gctgccagaa	tcgcagagta	gctatctggg	2880
tcacagtaga	acacacgggtc	agcagccgga	acatagttct	tggtcagagc	cgacagagcc	2940
ttagtcagag	ccgcaataat	ctccttacc	agcgcaactt	ggtcgggtcaa	gtgcccgtt	3000
gttctgagtg	gtctcaatta	cggtagcagt	acctaagccc	tcgggggatc	tggggaggaa	3060
tgagatatga	aaaagcctga	actcaccgcg	acgtctgtcg	agaagtttct	gatcgaaaag	3120
ttcgacagcg	tctccgacct	gatgcagctc	tcggaggggcg	agaatctcg	tgctttcagc	3180
ttcgatgtag	gagggcggtg	atatgtcctg	cgggtaaata	gctgcgccga	tggtttctac	3240
aaagatcggt	atgtttatcg	gcactttgca	tcggccgcgc	tcccgattcc	ggaagtgcct	3300
gacattgggg	agtttagcga	gagcctgacc	tattgcatct	cccgcctg	acaggggtgc	3360
acgttgcaag	acctgcctga	aaccgaactg	cccgtgttc	tacaaccggt	cgcgagggt	3420
atggatgcga	tcgctgcggc	cgatcttagc	cagacgagcg	ggttcggccc	attcggaccg	3480
caaggaatcg	gtcaatacac	tacatggcgt	gatttcatat	gcgcgattgc	tgatccccat	3540
gtgtatcact	ggcaaactgt	gatggacgac	accgtcagtg	cgtccgtcgc	gcaggctctc	3600
gatgagctga	tgctttgggc	cgaggactgc	cccgaagtcc	ggcacctcgt	gcacgcggat	3660
ttcgggtcca	acaatgtcct	gacggacaat	ggccgcataa	cagcgggtcat	tgactggagc	3720
gagggcatgt	tcggggattc	ccaatacgag	gtcgccaaca	tcttcttctg	gagggcgtgg	3780
ttgcttcta	tgaggcagca	gacgcgtac	tgagcggga	ggcatccgga	gcttgacgga	3840
tcgccacgac	tcggggcgta	tatgctccgc	attggtcttg	accaactcta	tcagagcttg	3900
gttgacggca	atttcgatga	tcgagcttg	gcgcagggtc	gatgcgacgc	aatcgtccga	3960
tccggagccg	ggactgtcgg	gcgtacacaa	atcgcccgca	gaagcgcggc	cgtctggacc	4020
gatggctgtg	tagaagtact	cgccgatagt	ggaaaccgac	gccccagcac	tcgtccgagg	4080
gcaaagaaat	agagtaggta	ccagcaccac	cagcggtag	gtgcggaact	tctacaacct	4140
caaagcccat	aacgttgcg	atagaaccct	tctcagggtc	aatcagagca	gcgtagtgtg	4200
ctgcgttcgg	catcagtgtc	gccagaatcg	cagagtagct	atctgggtca	cagtagaaca	4260
cacggtcagc	agccggaaaca	tagttcttgg	tcagagccgc	acgagcctta	gtcagagccg	4320
caataatctc	cttaccacagc	gcaacttggt	cggtaagtgc	ggccttgttc	tgagtgggtc	4380
caattacggg	agcagtagct	aagccctcgg	gggatcagct	tggtgtttt	ggcggatgag	4440
agaagatttt	cagcctgata	cagattaaat	cagaacgcag	aagcgggtctg	ataaaacaga	4500
atttgccctg	cggcagtagc	gcggtgggtc	cacctgacct	catgccgaac	tcagaagtga	4560
aacgccgtag	cgccgatggt	agtgtgggg	ctccccatgc	gagagtaggg	aactgccagg	4620
catcaaataa	aacgaaaggc	tcagtcgaaa	gactgggcct	ttcgttttat	ctgttggttg	4680
tcggtgaacg	ctctcctgag	taggacaaat	ccgcccggag	cggatttgaa	cgttgcgaag	4740
caacggcccg	gaggggtggc	ggcaggacgc	ccgccataaa	ctgccaggca	tcaaatttaag	4800
cagaaggcca	tcctgacgga	tgcccttttt	gcgtttctac	aaactctttt	tgtttatttt	4860
tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctgg	ggatcagct	tgatggccgc	cagtgtgttg	4920
gatgggaagt	tcttattatt	taggttagtc	aggtatttcc	atttcaaaaa	aaaaaaagt	4980
aaaaaagaaa	aattgggttg	cgctatatat	atgaaagagt	atacaataat	gatgtatttg	5040
gcaaatcaaa	taccatgggtc	taataatcaa	acattctgat	tagttgataa	ttcaaattgt	5100
gagcgctcac	aatttgaaag	attcctgtga	aaagtttcat	taacacggaa	ttcgtgtcga	5160
gtagaccttg	ttgttggtgag	aattcttaat	tcatgagttg	tagggaggga	tttatgtcac	5220
cacaaacaga	gactaaagca	agtgttggt	tcaaagctgg	tgtaaagag	tacaaattga	5280
cttattatac	tcctgagtac	caaaccaagg	atactgatat	attggcagca	ttccgagtaa	5340
ctcctcaacc	tggaagttcca	cctgaagaag	caggggccgc	ggtagctgcc	gaatcttcta	5400
ctggtacatg	gacaaactgta	tggaaccgatg	gacttaccag	ccttgatcgt	tacaaagggc	5460
gatgctaccg	catcgagcgt	gttggttgag	aaaaagatca	atatattgct	tatgtagctt	5520
acccttttaga	cctttttgaa	gaaggttctg	ttaccaacat	gtttacttcc	attgtaggta	5580
acgtattttg	gttcaaagcc	ctgcgcgctc	tacgtctgga	agatctgcga	atccctcctg	5640
cttatgttaa	aactttccaa	ggtccgcctc	atgggatcca	agttgaaaga	gataaattga	5700
acaagtatgg	tcgtccccctg	ttgggatgta	ctattaaacc	ttaattgggg	ttatctgcta	5760
aaaactacgg	tagagccggt	tatgaatgtc	ttcgcggtgg	acttgatttt	actaaagatg	5820
atgagaacgt	gaactcacaa	ccatttatgc	gttgagaga	tcgtttctta	ttttgtgccg	5880
aagcacttta	taaagcacag	gctgaaacag	gtgaaatcaa	agggcattac	ttgaatgcta	5940
ctgcaggtac	atgcgaagaa	atgatcaaaa	gagctgtatt	tgctagagaa	ttgggcgttc	6000
cgatcgtaat	gcattgactac	ttaacggggg	gattcaccgc	aaatactagc	ttggctcatt	6060

```

attgccgaga taatgggtcta cttcttcaca tccaccgtgc aatgcatgcg gttattgata 6120
gacagaagaa tcatgggtatc cacttccggg tattagcaaa agcggttacgt atgtctggtg 6180
gagatcatat tcaactctggt accgtagtag gtaaacttga aggtgaaaga gacataactt 6240
tggtgctttgt tgatttactg cgtgatgatt ttgttgaaca agatcgaagt cgcggtatct 6300
atttcaactca agattgggtc tctttaccag gtgttctacc cgtggcttca ggaggtattc 6360
acgtttggca tatgcctgct ctgaccgaga tctttgggga tgattccgta ctacagttcg 6420
gtggaggaac tttaggacat ccttggatct gcagctagtt ctaga 6465

```

<210> 26

<211> 7057

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN del vector pVTPA-Estrep entre los bordes atpB de arroz y rbcL de tabaco.

<400> 26

```

gtcgagggtca tgtcctgaag ttctttgtaa cgttgtaaag tttgcttaac tctttgtgca 60
gtttcataat gttcgttgcc aacgatccga gggtgtaaca tagttgaggt tgaatctaaa 120
ggatctactg caggataaat ccctttggaa gctaactctc tggaaaagtac ggtagtagca 180
tccaaatgtg caaatgttgt agcaggagca gggtcggtca aatcgtccgc aggtacataa 240
accgcttgga tcgaagttat agatcccttt ttagtagaag taattctttc ttgcaaagaa 300
cccatttctg tactaagagt aggttgataa cccactgcag agggcattct ccctaataag 360
gcagatacct ccgatcctgc ttgaacaaaa cgaaagatat tatcgatgaa tagaagcacg 420
tcttgcttat taacatctcg gaaatattct gccatagtta gggcagtcaa accaactctc 480
atacgagctc ctggcggttc attcatttgg ccatagacta gagctacctt tgattcctca 540
agattttttt cattaattac tccagattcc ttcatittcca tataaagatc atttccttca 600
cgagtccggt ccctactccc gccaaatacg gatacgcccc cgtgagcttt agcaatattg 660
ttgattaatt ccatgatgag tactgtttta cctactccag ctcccccaa tagtccgatt 720
tttctccac gccgataagg agctaaaaga tcgaccacct taataccagt ttcaaagatg 780
gataatttcg tatctaactc gataaaggcg ggcgcggatc tatgaatagg gaatgttgca 840
ctagtatcta caggacccaa attgtcaaca ggctcccca gaacggtgaa aattcgtcca 900
agagtagctc caccgacagg aacactgaga ggagctcccg tgtcaatcac ttccattcct 960
ctcatcaacc catctgtagc actcatagct acagctctaa ctcgattatt tcctaataat 1020
tgttgtacct cacaagttac attaatttgc ttaccgtcag tgtctcgact cttgactacc 1080
aaagcattat aaatataagg taacttgccc gggggaaaag tgacatccag cacgggtcca 1140
ataatttgat cgatacgccc tgtacttttt tcttcaattg tagaaacccc gggagcgaaa 1200
gtagtaggat tgggtctcat aattatcaca taattttcaa aaaaaaggaa tttatcgaaa 1260
ttttgatttt tttcttggtg aataatgcca aatcaacacc aaaaaatat ccaaaaatcc 1320
aaaagtcaaa aggaaatgaa ttagttaatt caataagaga gaaaagggga ccagcacttg 1380
atttcgttgc ccaaacgaat ccatttcaat cgtttactca tggaatgagt ccgtcggaaa 1440
gttcaatcaa tctttttttc atatacatct tgccctttgt aaacgatttg tgcctactct 1500
actttcttat ctaggacttc gatatacaaa atatatacta ctgtgaagca tagattgctg 1560
tcaacagaga attttcgtag tatttaggta tttccactca aaataagaaa agggggtcta 1620
ttaagaactt aataaggatt agaagttgat ttgggggttg gctatatcta ttaaagagta 1680
tacaataaag atggatttgg tgaatcaaat ccatggttta ataactgaag catgttaact 1740
tacaataaca acaactcaag tcgaatgaat tcctatagca tagaatgtac acagggtgta 1800
cccattatat atgaatgaaa catattatat gaatgaaaca tattcattaa cttaagcatg 1860
ccccccattt tgtcgacggg atcgataagc ttgatatcga attcaccttg gttgacacga 1920
gtatataagt catgtttatc tgttgaataa aaagccttcc attttgatta aataaaggag 1980
gattttcata tgtatcgatt acgtaaggag gaataaacca tgattgctgg acctgagtg 2040
ctgctagacc gtccatctgt caacaacagc caattagttg ttagcgttgc tgggtactgt 2100
gaggggacga atcaagacat tagtcttaaa ttttttgaaa ttgacctaac atcacgcct 2160
gctcatggag gaaagacaga gcaaggctta agtccaaaat tgctactgat 2220
agtggcgca tgccacataa acttgaaaaa gctgacttac taaaggctat tcaagaacaa 2280
ttgatcgcta acgtccacag taacgacgac tactttgagg tcattgattt tgcaagcgat 2340
gcaaccatta ctgatcgaaa cggcaaggtc tactttgctg acaaagatgg ttcggtaacc 2400

```


ttgccgaccc	aacctgtcca	agaatTTTTg	ctaagcggac	atgtgcgcgt	tagaccatat	2460
aaagaaaaac	caatacaaaa	tcaagcgaaa	tctgttgatg	tggaatatac	tgtacagttt	2520
actcccttaa	accctgatga	cgatttcaga	ccaggtctca	aagatactaa	gctattgaaa	2580
acactagcta	tcggtgacac	catcacatct	caagaattac	tagctcaago	acaaagcatt	2640
ttaaacaaaa	cccacccagg	ctatacgatt	tatgaacgtg	actcctcaat	cgtcactcat	2700
gacaatgaca	ttttccgtac	gattttacca	atggatcaag	agtttactta	ccatgtcaaa	2760
aatcggaac	aagcttatga	gatcaataaa	aaatctgggtc	tgaatgaaga	aataaacaac	2820
actgacctga	tctctgagaa	atattacgtc	cttaaaaaag	gggaaaagcc	gtatgatccc	2880
tttgatcgca	gtcacttgaa	actgttcacc	atcaaatacg	ttgatgtcaa	caccaacgaa	2940
ttgctaaaaa	gcgagcagct	cttaacagct	agcgaacgta	acttagactt	cagagattta	3000
tacgatcctc	gtgataaggc	taaactactc	tacaacaatc	tcgatgcttt	tggtattatg	3060
gactatacct	taactggaaa	agtagaggat	aatcacgatg	acaccaaccg	tatcataacc	3120
gtttatatgg	gcaagcgacc	cgaaggagag	aatgctagct	atcatttagc	ctatgataaa	3180
gatcggtata	ccgaagaaga	acgagaagtt	tacagctacc	tgcgttatac	agggacacct	3240
atacctgata	accctaacga	caaataagga	tcctgatatac	aagcttctcg	agtgaacgcg	3300
tatagggccc	aattcgagct	cgggtaccagc	accaccagcg	gtgaggtgcg	gaacttctac	3360
aacctcaaag	cccataacgt	tgcggataga	acccttctca	gggtcaatca	gagcagcgta	3420
gtttgctgcg	ttcggcatca	gtgctgccag	aatcgagag	tagctatctg	ggtcacagta	3480
gaacacacgg	tcagcagccg	gaacatagtt	cttgggtcaga	gccgcacgag	ccttagtcag	3540
agccgcaata	atctccttac	ccagcgcaac	ttgggtcggtc	aagtgcggcc	ttgttctgag	3600
tggtctcaat	tacggtagca	gtacctaaag	cctcggggga	tctggggagg	aatgagatat	3660
gaaaaagcct	gaactcaccc	cgacgtctgt	cgagaagtgt	ctgatcgaaa	agttcgacag	3720
cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggt	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	3780
aggagggcgt	ggatatgtcc	tgcgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	3840
ttatgtttat	cggcactttg	catcgccgcg	gctcccgatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	3900
ggagtttagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgccgt	gcacaggggtg	tcacgttgca	3960
agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgctgt	tctacaaccg	gtcgcggagg	ctatggatgc	4020
gatcgctgcg	gccgatctta	gccagacgag	cggttccggc	ccattcggac	cgcaaggaat	4080
cgggtcaatac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	4140
ctggcaaac	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgctccgtc	gcgcaggctc	tcgatgagct	4200
gatgctttgg	gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atttcggctc	4260
caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	4320
gttcggggat	tcccaatacg	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	ggttggcttg	4380
tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgcat	gatcgccacg	4440
actccgggcg	tatatgctcc	gcattgggtc	tgaccaactc	tatcagagct	tggttgacgg	4500
caatttcgat	gatgcagctt	gggcgcaggg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	4560
cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	4620
tgtagaagta	ctcgccgata	gtggaaaccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaagaa	4680
atagagttag	taccagcacc	accagcgggt	agggtcgga	cttctacaac	ctcaaagccc	4740
ataacgttgc	ggatagaacc	cttctcaggg	tcaatcagag	cagcgtagtt	tgctcggttc	4800
ggcatcagtg	ctgccagaat	cgcagagtag	ctatctgggt	cacagtagaa	cacacggtca	4860
gcagccggaa	catagtctct	ggtcagagcc	gcacgagcct	tagtcagagc	cgcaataatc	4920
tccttaccca	gcgcaacttg	gtcggtaagt	gcggccttgt	tctgagtggg	ctcaattacg	4980
gtagcagtac	ctaagccctc	gggggatcag	cttggctgtt	ttggcggatg	agagaagatt	5040
ttcagcctga	tacagattaa	atcagaacgc	agaagcggtc	tgataaaaac	gaatttgcct	5100
ggcggcagta	gcgcgggtgt	cccacctgac	cccatgccga	actcagaagt	gaaacgcgct	5160
agcgcgatg	gtagtgtggg	gtctccccat	gcgagagtag	ggaactgcc	ggcatcaaat	5220
aaaacgaaa	gctcagtcga	aagactgggc	ctttcgtttt	atctgttgtt	tgtcggtgaa	5280
cgctctcctg	agtaggacaa	atccgcgggg	agcggatttg	aacgttgcca	agcaacggcc	5340
cggaggggtg	cgggcaggac	gcccgcata	aactgccagg	catcaaatta	agcagaaggc	5400
catcctgacg	gatggccttt	ttgcgtttct	acaaactctt	tttgtttatt	tttctaaata	5460
cattcaaata	tgtatccgct	gggggatcag	cttgatggcc	gccagtgtga	tggatgggaa	5520
gttcttatta	tttaggttag	tcagggtattt	ccatttcaaa	aaaaaaaaaa	gtaaaaaaga	5580
aaaattgggt	tgcgctatat	atatgaaaga	gtatacaata	atgatgtatt	tggcaaatca	5640
aataccatgg	tctaataatc	aaacattctg	attagttgat	aattcaaatt	gtgagcgctc	5700
acaatttgaa	agattcctgt	gaaaagtttc	attaacacgg	aattcgtgtc	gagtagacct	5760
tgttggttg	agaattctta	attcatgagt	tgtaggagg	gatttatgtc	accaacaaca	5820
gagactaaag	caagtgttgg	attcaaagct	ggtgttaaag	agtacaaatt	gacttattat	5880
actcctgagt	accaaacc	ggatactgat	atattggcag	cattccgagt	aactcctcaa	5940
cctggagttc	cacctgaaga	agcaggggcc	gcggtagctg	ccgaatcttc	tactggtaca	6000
tggacaactg	tatggaccga	tggacttacc	agccttgatc	gttacaaagg	gcgatgctac	6060

cgcatcgagc	gtggtggttg	agaaaaagat	caatatattg	cttatgtagc	ttacccttta	6120
gacctttttg	aagaagggtc	tgttaccaac	atgtttactt	ccattgtagg	taacgtattt	6180
gggttcaaag	ccctgcgcgc	tctacgtctg	gaagatctgc	gaatccctcc	tgcttatggt	6240
aaaactttcc	aaggcccgcc	tcatgggatc	caagttgaaa	gagataaatt	gaacaagtat	6300
ggtcggtccc	tggtgggatg	tactattaaa	cctaaattgg	ggttatctgc	taaaaactac	6360
ggtagagccg	tttatgaatg	tcttcgcggt	ggacttgatt	ttactaaaga	tgatgagaac	6420
gtgaactcac	aaccatttat	gcgttgagga	gatcgtttct	tattttgtgc	cgaagcactt	6480
tataaagcac	aggctgaaac	aggtgaaatc	aaagggcatt	acttgaatgc	tactgcaggt	6540
acatgcgaag	aaatgatcaa	aagagctgta	tttgctagag	aattgggctg	tccgatcgta	6600
atgcatgact	acttaacggg	gggattcacc	gcaaatacta	gcttggtcca	ttattgccga	6660
gataatggtc	tacttcttca	catccaccgt	gcaatgcatg	cggttattga	tagacagaag	6720
aatcatggta	tccacttccg	ggtattagca	aaagcggtac	gtatgtctgg	tggagatcat	6780
attcactctg	gtaccgtagt	aggtaaaactt	gaaggtgaaa	gagacataac	tttgggcttt	6840
gttgatttac	tgcgtagatg	ttttgttgaa	caagatcgaa	gtcgcgggat	ttattttcact	6900
caagattggg	tctctttacc	aggtgttcta	cccgtggctt	caggagggtat	tcacgttttg	6960
catatgcctg	ctctgaccga	gatctttggg	gatgattccg	tactacagtt	cggtggagga	7020
actttaggac	atccttggtg	ctgcagctag	ttctaga			7057

Lic. Mariela Vázquez Castillo
 Agente Oficial, CIGBO



REIVINDICACIONES

VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANGIOSPERMAS TRANSPLASTÓMICAS.

- 1) Un vector de ADN útil para la transformación estable y expresión de genes en plastidios, donde el gen a expresar se introduce en una región intergénica artificial formada por la combinación de dos regiones 5' no traducibles de genes que se transcriben en direcciones divergentes y pertenecientes a plantas de divisiones o clases diferentes.
- 2) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 1, útil para lograr una alta frecuencia de transformación estable y expresión de genes en plastidios de plantas Angiospermas, con las siguientes características:
 - a) contiene una región intergénica artificial donde es posible insertar secuencias de ADN que codifican para un polipéptido, bajo señales apropiadas para su transcripción y traducción en plastidios empleando secuencias terminadoras de la transcripción de origen no plastídico,
 - b) la región intergénica artificial está flanqueada por dos genes que se transcriben de forma natural en el genoma de los plastidios en direcciones opuestas, y cuyas secuencias nucleotídicas son idénticas a secuencias codificantes de los genes *atpB* y *rbcL* pertenecientes a plastidios de plantas Angiospermas de clases diferentes.
 - c) la región intergénica artificial se compone de: secuencias 5' reguladoras de la transcripción y traducción de los genes *atpB* y *rbcL*; sitios de restricción para la inserción de genes de interés seguidos de un terminador de origen no plastídico; y de una segunda región 5' reguladora de la transcripción y traducción de un gen *rbcL* perteneciente a plastidios de Angiospermas de una clase diferente a la anterior.
- 3) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga una secuencia nucleotídica flanqueante homóloga a la secuencia del gen plastídico *rbcL* de tabaco o arroz.
- 4) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 3, donde la secuencia homóloga al gen *rbcL* comprende al menos un fragmento de la secuencia de nucleótidos que abarca desde la posición -291 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en plastidios de tabaco, hasta la posición +1233 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.

- 5) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 4 cuya secuencia flanqueante homóloga al gen *rbcL* comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 4.
- 6) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga una secuencia nucleotídica flanqueante homóloga a la secuencia del gen plastídico *atpB* de arroz o tabaco.
- 7) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 6, donde la secuencia homóloga al gen *atpB* comprende al menos un fragmento de la secuencia de nucleótidos que abarca desde la posición -654 de la secuencia nucleotídica que codifica para esta proteína en plastidios de arroz, hasta la posición +1211 a partir del codón de inicio de traducción de este gen.
- 8) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 7 cuya secuencia flanqueante homóloga al gen *atpB* comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 8.
- 9) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, donde el terminador de la transcripción de origen no plastídico presente en la región intergénica artificial sea el terminador bidireccional rrnBT1T2 u otro homólogo a este.
- 10) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que contenga insertado en la región intergénica artificial un gen que permita la selección de las plantas transplastómicas.
- 11) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección puede ser eliminado mediante recombinación homóloga entre secuencias de ADN repetidas que se encuentran a ambos extremos del gen.
- 12) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 11, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto antimicrobiano.
- 13) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 12, donde el compuesto antimicrobiano en cuestión pertenezca al grupo de los amino-glicósidos.
- 14) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 13, donde el compuesto antimicrobiano sea la Higromicina-B.
- 15) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 13, donde el compuesto antimicrobiano sea la Espectinomicina.
- 16) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 12, donde el compuesto antimicrobiano en cuestión pertenezca al grupo de las sulfonamidas.

- 17) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 16, donde el compuesto antimicrobiano sea la sulfadiazina.
- 18) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto herbicida.
- 19) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la glutamina sintetasa.
- 20) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 19, donde el compuesto herbicida sea el glufosinato (fosfinotricina).
- 21) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 19, donde el compuesto herbicida sea el bialaphos.
- 22) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS).
- 23) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 22, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el glifosato (N-fosfometil glicina).
- 24) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la ruta de síntesis del folato.
- 25) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 24, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el asulam (metil-(4-aminobenzenosulfonil)-carbamato).
- 26) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores de la acetolactato sintasa.
- 27) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 26, donde el compuesto herbicida en cuestión sea una sulfonilurea.
- 28) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 26, donde el compuesto herbicida en cuestión sea una imidazolinona.
- 29) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 18, donde el compuesto herbicida en cuestión pertenezca al grupo de los inhibidores del fotosistema II.
- 30) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 29, donde el compuesto herbicida en cuestión sea el bromoxinil (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo).

- 31) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 10, donde el gen que permite la selección codifica para una proteína que permite a la célula vegetal sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico.
- 32) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 31, donde el compuesto tóxico en cuestión sea la betaína aldehído.
- 33) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 8, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-A o variantes de la misma.
- 34) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-B o variantes de la misma.
- 35) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-C o variantes de la misma.
- 36) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-D o variantes de la misma.
- 37) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-E o variantes de la misma.
- 38) Un vector de ADN de acuerdo a las reivindicaciones de la 1 a la 11, que responda a la estructura general descrita en la Figura 1-F o variantes de la misma.
- 39) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 2, que presente en la segunda región 5' no traducible del gen *rbcL* una secuencia funcionalmente homóloga al sitio de unión del represor lacI de *Escherichia coli*.
- 40) Un vector de ADN que presente 5' al inicio de traducción del gen *rbcL* una secuencia de ADN que permita la represión de la transcripción de este gen en condiciones de no inducción, de forma tal que facilite el mantenimiento y multiplicación del vector en un hospedero cualquiera.
- 41) Un vector de ADN de acuerdo a la reivindicación 40, que presente en la región 5' no traducible del gen *rbcL* una secuencia funcionalmente homóloga al sitio de unión del represor lacI de *Escherichia coli*.
- 42) Un vector de ADN según la reivindicación 41, donde la secuencia nucleotídica del operador del operón lactosa de *Escherichia coli* se corresponda al menos en parte a la secuencia destacada en la secuencia SEQ. ID. NO: 3

- 43) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 1 a la 11, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.
- 44) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 12 a la 17, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.
- 45) Un vector de ADN según las reivindicaciones de la 18 a la 38, que contenga insertado en la región intergénica artificial una o más unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas bajo uno o más promotores funcionales en plastidios.
- 46) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos uno de los promotores funcionales en plastidios sea uno de los promotores *rbcL* de la región intergénica artificial.
- 47) Un vector de ADN según la reivindicación 46, donde uno de los promotores funcionales en plastidios es el promotor *rbcL* de arroz comprendido en la secuencia SEQ. ID. NO: 8.
- 48) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos uno de los promotores funcionales en plastidios sea el promotor *psbA** comprendido en la secuencia SEQ. ID. NO:16 o variantes de la misma.
- 49) Un vector de ADN según la reivindicación 48, donde un minicistrón se encuentre funcionalmente ligado al promotor *psbA**.
- 50) Un vector de ADN según la reivindicación 49, donde el minicistrón posea una secuencia nucleotídica homóloga a la secuencia destacada en la secuencia SEQ. ID. NO:17 o variantes de la misma.
- 51) Un vector de ADN para la introducción y expresión estable de genes en plastidios que utilice un minicistrón para aumentar la expresión de los genes introducidos a las células transplastómicas.
- 52) Un vector de ADN según las reivindicaciones 43, 44 ó 45, donde al menos un gen de interés agrícola, veterinario, farmacéutico, alimentario o industrial sea componente de una de las unidades transcripcionales presentes en el vector.
- 53) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína con actividad insecticida.


- 54) Un vector de ADN según la reivindicación 53, donde la proteína insecticida pertenezca a la familia de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.
- 55) Un vector de ADN según la reivindicación 53, donde la proteína insecticida sea un inhibidor de proteasas.
- 56) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para un polipéptido con actividad anti-microbiana.
- 57) Un vector de ADN según la reivindicación 56, donde el polipéptido con actividad anti-microbiana pertenezca a uno de los grupos de las proteínas vegetales relacionadas con la patogenicidad (PR-proteínas).
- 58) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una glucanasa.
- 59) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una quitinasa.
- 60) Un vector de ADN según la reivindicación 57, donde la PR-proteína en cuestión sea una proteína tipo-taumatina.
- 61) Un vector de ADN según la reivindicación 56, donde el polipéptido en cuestión sea una proteína inactivadora de ribosomas (RIP).
- 62) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que confiera resistencia a estrés abióticos.
- 63) Un vector de ADN según la reivindicación 62, donde la proteína en cuestión tenga actividad colina oxidasa.
- 64) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que contribuya a aumentar el rendimiento productivo de la planta donde este se exprese.
- 65) Un vector de ADN según la reivindicación 64, donde la proteína en cuestión esté involucrada en el mejoramiento de la capacidad fotosintética de la planta.
- 66) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad fructosa-1,6 bifosfatasa (FBPasa).
- 67) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad protoporfirinogeno oxidasa (PROTOX).
- 68) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión tenga actividad ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO).

- 69) Un vector de ADN según la reivindicación 65, donde la proteína en cuestión participe directa o indirectamente en el proceso de fijación de carbono de la planta donde se exprese.
- 70) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés agrícola codifique para una proteína que contribuya a aumentar la conservación post-cosecha de los productos de la planta donde este se exprese.
- 71) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés alimentario codifique para una proteína que contribuya a mejorar la calidad nutricional de los productos de la planta donde este se exprese.
- 72) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para una citoquina.
- 73) Un vector de ADN según la reivindicación 72, donde la citoquina pertenezca a la familia de los interferones.
- 74) Un vector de ADN según la reivindicación 72, donde la citoquina pertenezca a la familia de las interleucinas.
- 75) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad moduladora de la respuesta inmune.
- 76) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad hormonal.
- 77) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea la insulina.
- 78) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea una hormona de crecimiento.
- 79) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea una hormona somatotrópica.
- 80) Un vector de ADN según la reivindicación 76, donde el polipéptido con actividad hormonal sea una hormona gonadotrópica.
- 81) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un factor de proliferación celular.
- 82) Un vector de ADN según la reivindicación 81, donde el factor de proliferación celular sea el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

- 83) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad hematopoyética.
- 84) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un receptor celular.
- 85) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un inhibidor de proteasas.
- 86) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un polipéptido con actividad trombolítica.
- 87) Un vector de ADN según la reivindicación 86, donde el polipéptido en cuestión es la estreptoquinasa.
- 88) Un vector de ADN según la reivindicación 86, donde el polipéptido en cuestión es el activador tisular del plasminógeno (t-PA).
- 89) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés veterinario o farmacéutico codifica para un antígeno vacunal.
- 90) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca a un virus.
- 91) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca a un virus de hepatitis.
- 92) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal sea el antígeno de superficie de la hepatitis B.
- 93) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de la hepatitis A.
- 94) Un vector de ADN según la reivindicación 91, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de la hepatitis C.
- 95) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de la fiebre aftosa (FMDV).
- 96) Un vector de ADN según la reivindicación 90, donde el antígeno vacunal pertenezca al virus de inmunodeficiencia humana (HIV).
- 97) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca a una bacteria.
- 98) Un vector de ADN según la reivindicación 89, donde el antígeno vacunal pertenezca a un protozoario.

- 99) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen en cuestión codifique para un fragmento de la región variable de una inmunoglobulina.
- 100) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen en cuestión codifique para una proteína multimérica.
- 101) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una inmunoglobulina.
- 102) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una hormona.
- 103) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es un antígeno vacunal.
- 104) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es una enzima.
- 105) Un vector de ADN según la reivindicación 100, donde la proteína multimérica es un receptor celular.
- 106) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés industrial codifique para una proteína componente de un biopolímero.
- 107) Un vector de ADN según la reivindicación 52, donde el gen de interés industrial codifique para una enzima.
- 108) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una proteasa.
- 109) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una lipasa.
- 110) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima sea una isomerasa.
- 111) Un vector de ADN según la reivindicación 107, donde la enzima tenga actividad glicosil-hidrolasa.
- 112) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima con actividad glicosil-hidrolasa sea una levanasacarasa.
- 113) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima con actividad glicosil-hidrolasa sea una invertasa.
- 114) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima actividad glicosil-hidrolasa sea una levanasa.
- 115) Un vector de ADN según la reivindicación 111, donde la enzima actividad glicosil-hidrolasa sea una dextranasa.

- 116) El cultivo de las células vegetales en presencia de citoquininas, antes de introducirles cualesquiera de los vectores de ADN enunciados en las reivindicaciones de la 1 a la 115, para aumentar la frecuencia de producción de plantas transplastómicas.
- 117) El empleo de kinetina según la reivindicación 116.
- 118) Las plantas Angiospermas transplastómicas establemente transformadas con cualquiera de los vectores de ADN enunciados en las reivindicaciones de la 1 a la 115.
- 119) La progenie de las plantas transplastómicas de la reivindicación 118.
- 120) Las plantas transplastómicas según las reivindicaciones 118 y 119 que expresen establemente al menos uno de los genes presentes en el vector de ADN utilizado para la transformación.
- 121) Las plantas transplastómicas de las reivindicaciones 118 y 119 con las proteínas atpB y/o rbcL híbridas.
- 122) El cultivo de las plantas transplastómicas de la reivindicación 120.
- 123) El cultivo de las células de las plantas transplastómicas de la reivindicación 120.
- 124) La purificación y utilización de la proteína o proteínas que producen las células de las plantas de la reivindicación 120 como resultado de la expresión del gen o los genes en cuestión.
- 125) Las plantas transplastómicas de las reivindicaciones de la 118 a la 121 que sean Angiospermas.
- 126) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 125 que sean dicotiledóneas.
- 127) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 126 que sean solanáceas.
- 128) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 127 que pertenezcan a una de las siguientes especies: tabaco, tomate o papa.
- 129) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 125 que sean monocotiledóneas.
- 130) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 129 que sean gramíneas.
- 131) Las plantas transplastómicas según la reivindicación 130 que pertenezcan a una de las siguientes especies: arroz, caña de azúcar, maíz, trigo o cebada.


Lic. Mariela Vázquez Castiella
Agente Oficial, CIGB

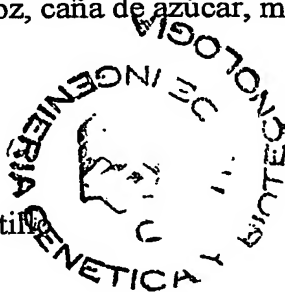
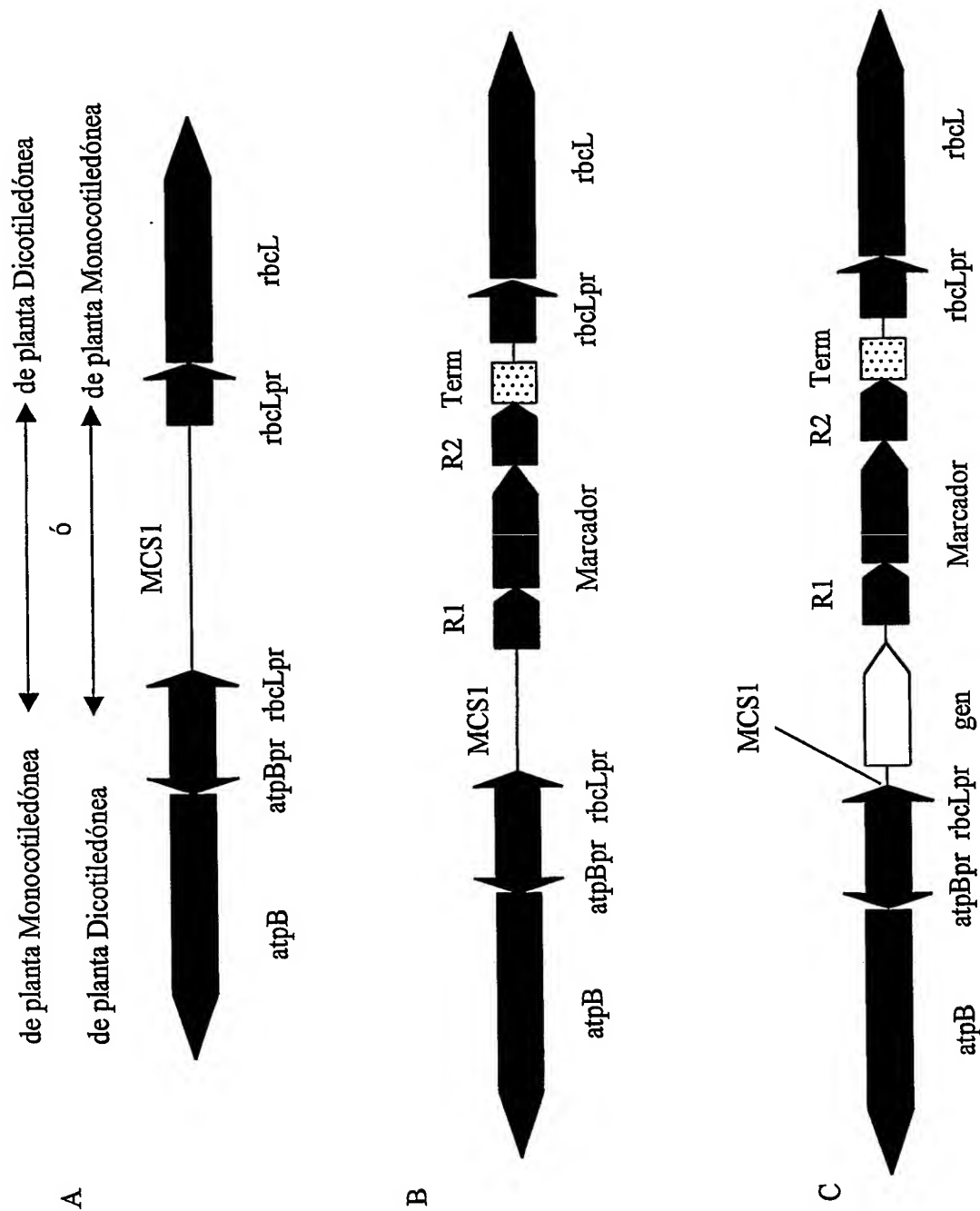


Figura 1.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
INSTITUTO DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Figura 1 (Continuación)

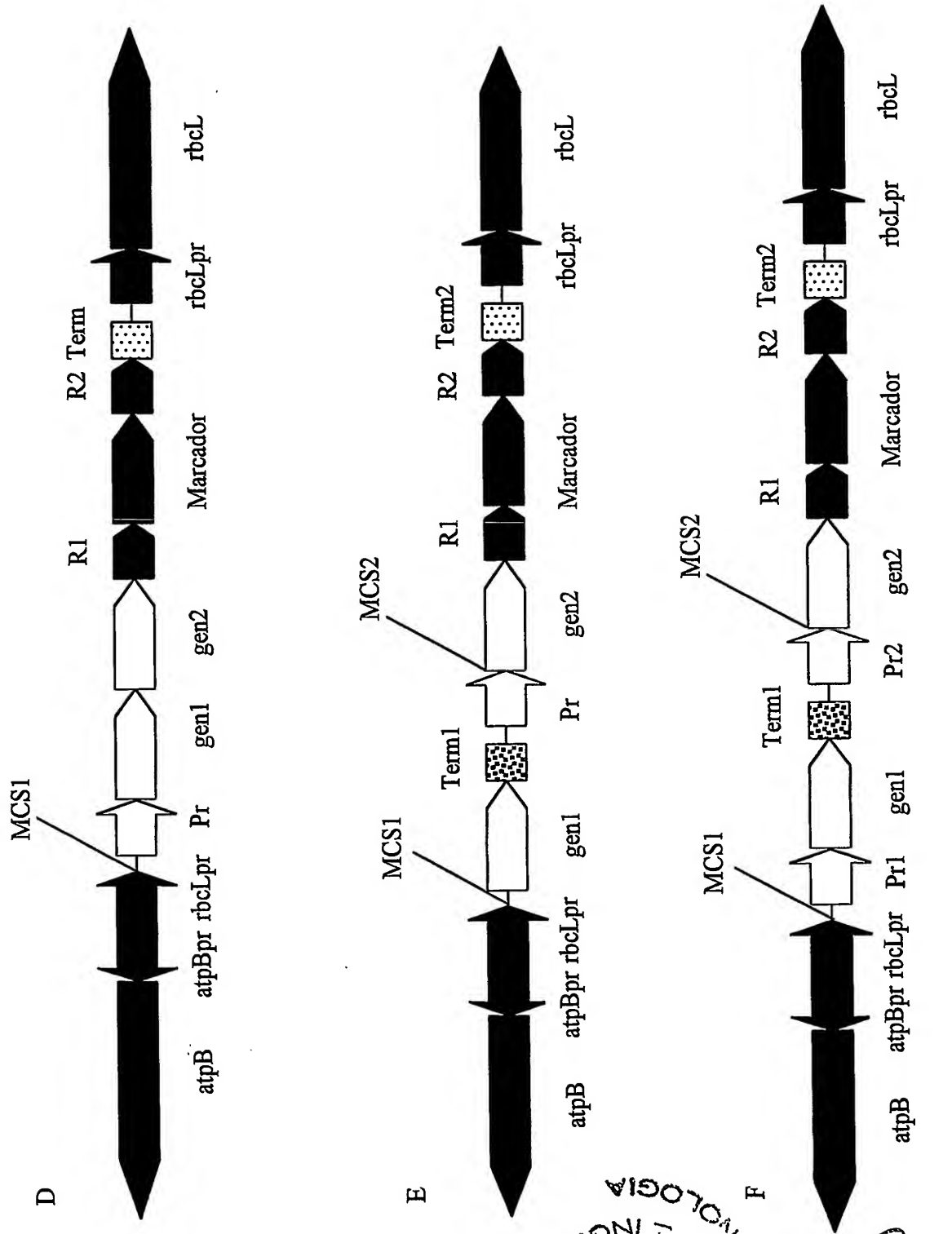


Figura 2.

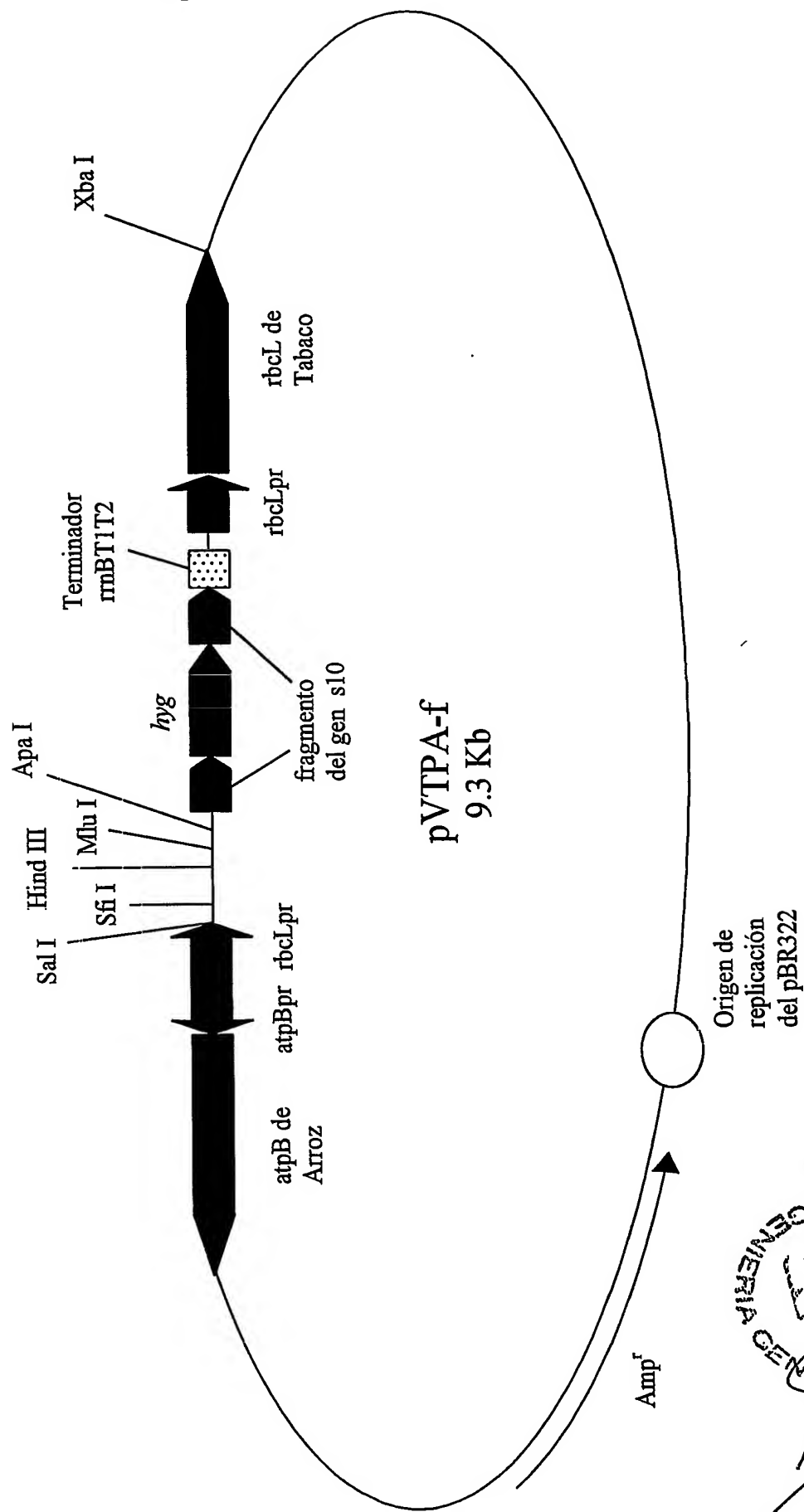
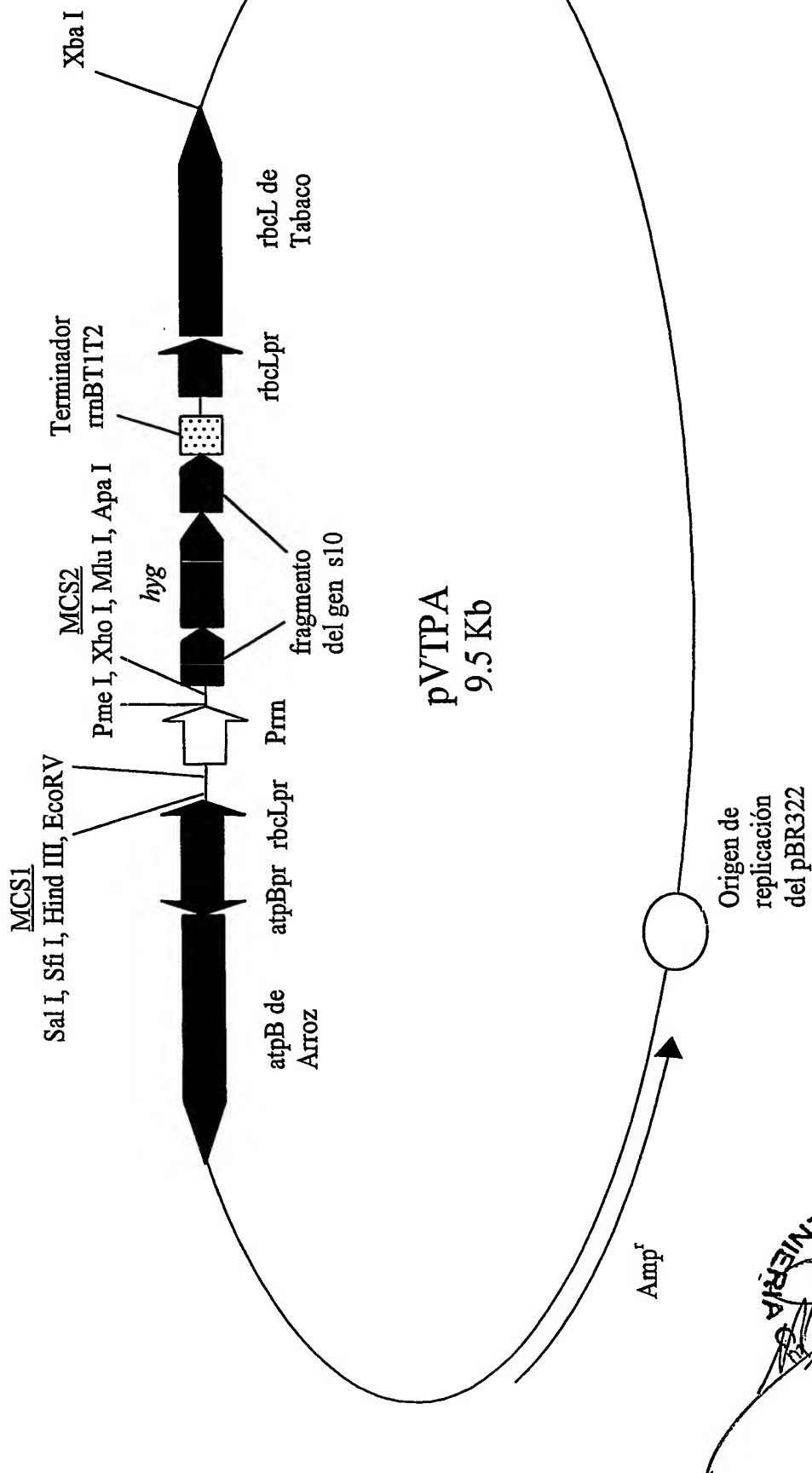
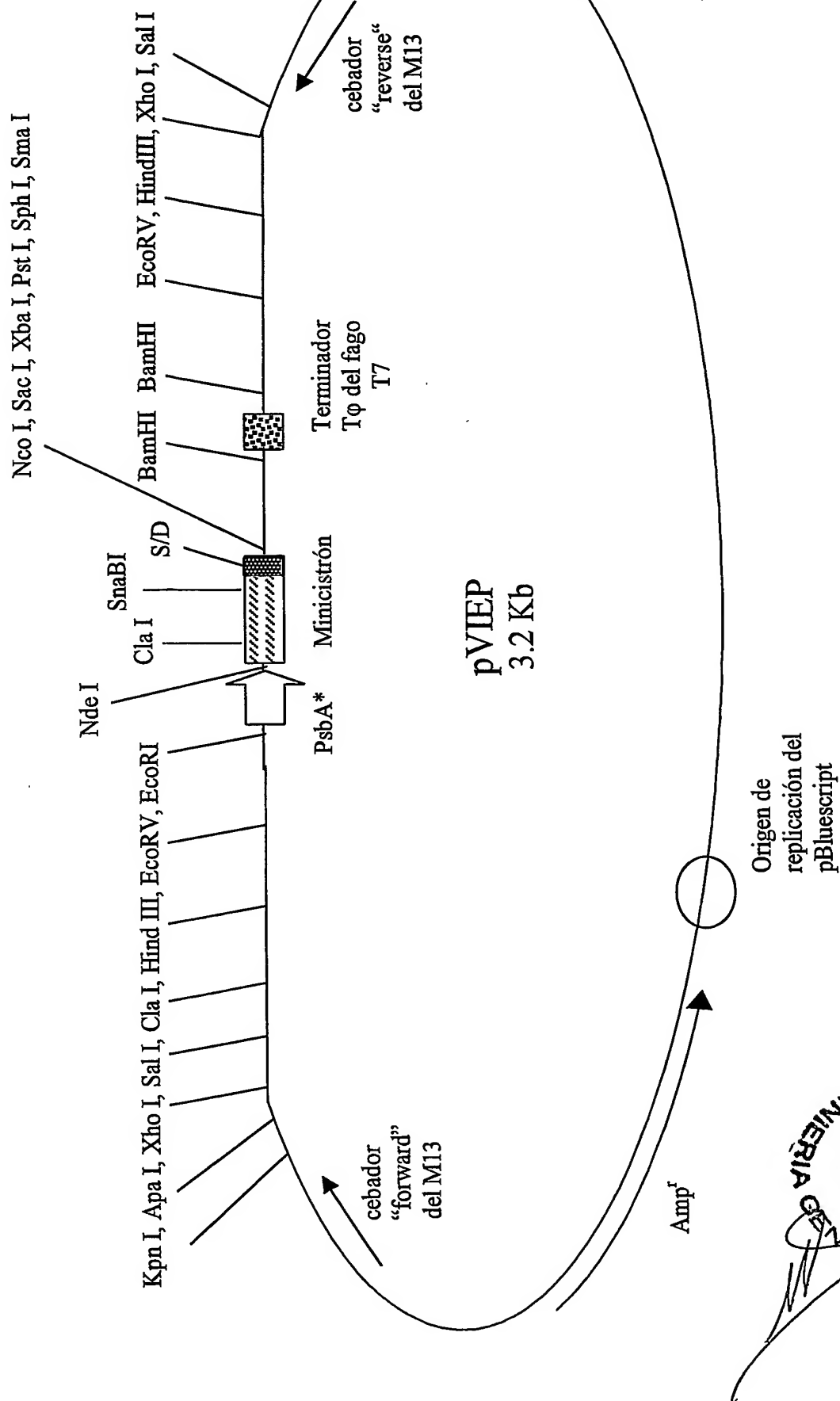


Figura 3.



INSTITUTO VENEZOLANO DE INGENIERIA Y BIOTECNOLOGIA

Figura 4.



INGENIERIA DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA

San Diego



Figura 5.

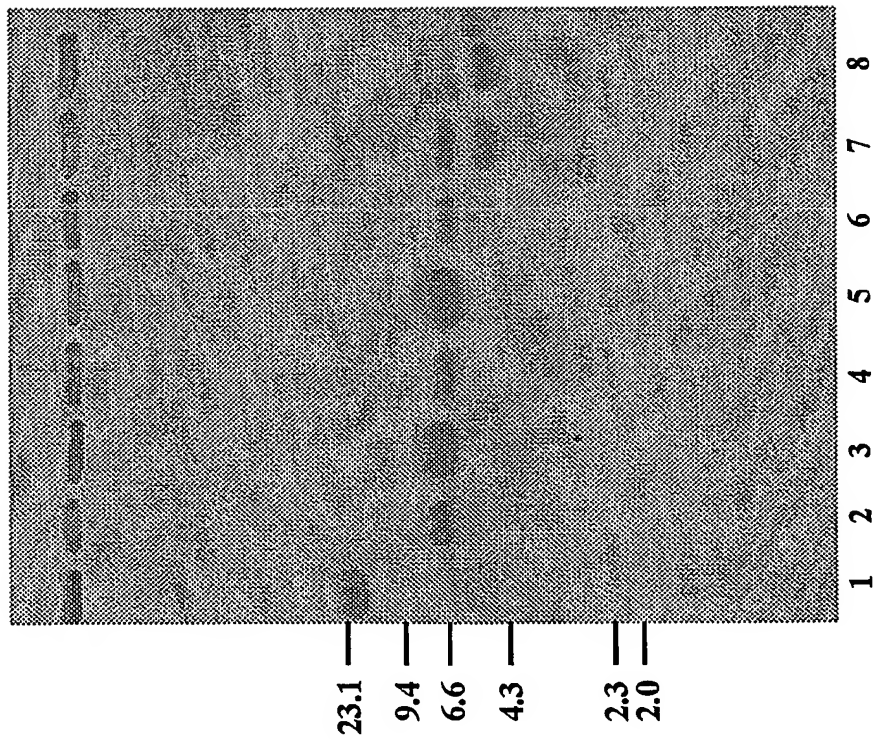
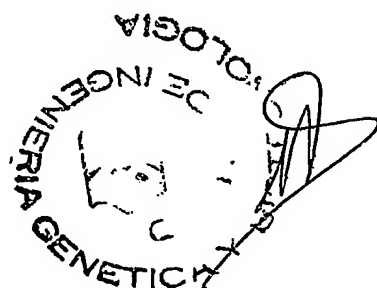
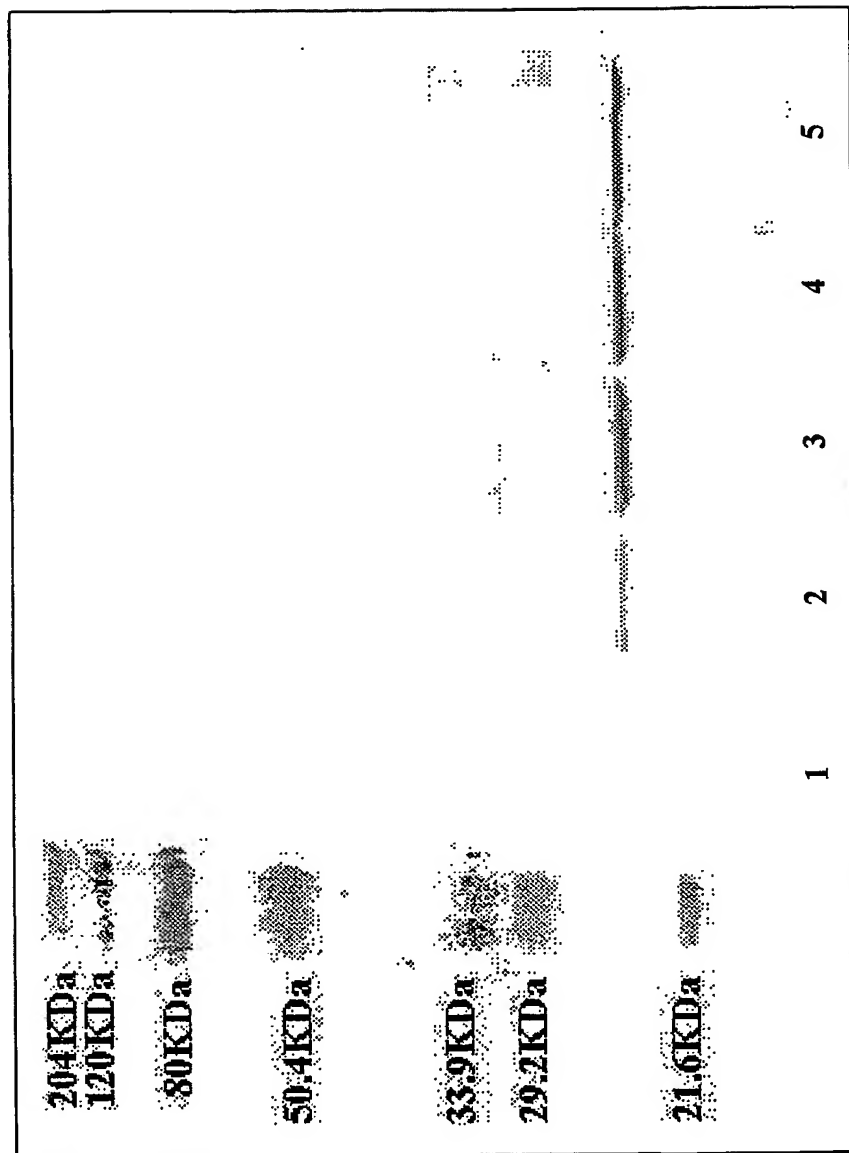


Figura 6.



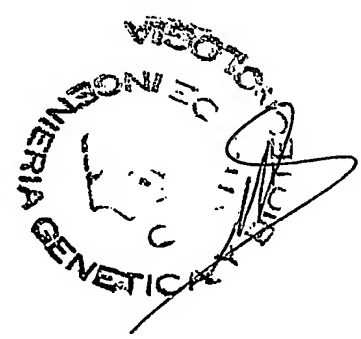


Figura 7.

